Synthese von 4-und 6-substituierten 4-En-3-ketosteroiden für den Radioimmunoassay von Testosteron und Progesteron

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Handschuh
aus Ulm

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547619_0001

Synthese von 4-und 6-substituierten 4-En-3-ketosteroiden für den Radioimmunoassay von Testosteron und Progesteron

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Handschuh
aus Ulm

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 9. September 1983

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1977 bis Juli 1982 unter der Leitung von Professor Dr. W. Voelter am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Voelter danke ich herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Winter danke ich für die ausführliche Diskussion der in seinem Arbeitskreis durchgeführten Röntgenstrukturanalysen.

Herrn Prof. Dr. E. Bayer danke ich für die Bereitstellung von Institutseinrichtungen.

Der Prof.-Dr.-Ing.-Erich-Müller-Stiftung danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Für die sorgfältige Aufnahme zahlreicher Spektren und die Durchführung von Analysen bin ich den folgenden Damen und Herren zu Dank verpflichtet:
Herrn P. Hütter (Röntgenstrukturanalysen), Herrn Dr. K. Albert, Herrn R. Bretthauer, Frau H. Clement, Herrn Dr. W. Fuchs und Herrn B. Meier (^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR), Herrn H. Bartholomä, Herrn Dr. R. Müller und Herrn Prof. Dr. K.P. Zeller (FD-MS, MS), Frau U. Förstel (IR), Frau M. Munari (CD), Frau E. Seifried und Herrn H.J. Wurmstich (Elementaranalysen).

Herrn G. Berger und Frau M. Munari möchte ich für die Anfertigung der Zeichnungen, Frau. R. Groemke-Luz für die Fotoarbeiten, Frau M. Handschuh für die Erstschrift und Frau K. Reichle für die Reinschrift der Arbeit herzlich danken.

Zu guter Letzt sei Herrn Dr. B. Koppenhöfer für viele Diskussionen, vor allem der Reaktionsmechanismen, gedankt.

A b s t r a c t

Handschuh, Dieter

SYNTHESE VON 4- und 6-SUBSTITUIERTEN 4-EN-3-KETOSTEROIDEN FÜR DEN RADIOIMMUNOASSAY VON TESTOSTERON UND PROGESTERON

Die für den Radioimmunoassay von Testosteron und Progesteron erforderlichen Steroidcarbonsäuren werden durch allylische Funktionalisierung in das alicyclische Grundgerüst eingeführt.

Die Reaktion der 6β-Bromderivate von Progesteron 1 bzw. von THP-Testosteron 3 mit 3-Mercaptopropionsäure unter S_N2-Bedingungen führt zu den 4-S-Mercaptopropionsäuren (Thioenolethern) 2 bzw. 6 und nicht zu den erwarteten 6α-Derivaten (Thioethern). Die Allylumlagerung wird durch ^{13}C- und ^{1}H-NMR- und UV-Spektroskopie bewiesen. Aus 6 erhält man nach Abspaltung der THP-Schutzgruppe das Testosteronderivat 7.

Die 6-Methylidencarbonsäuren von Testosteron 23 und von Progesteron 25 werden dargestellt: Aus den π-Allylpalladiumchloridkomplexen von Testosteron 8 und von Progesteron 9 entstehen durch allylische Alkylierung mit den entsprechenden CH-aciden Methylestern mit nur einer Esterfunktion die 6β-Phenyl- bzw. Methylsulfonylessigsäuremethylester von Testosteron 17A bzw. 18/2 und von Progesteron 19/2. Die bei der Reaktion entstehenden Nebenprodukte 17B, 18/1 und 19/1 werden spektroskopisch identifiziert. Die Röntgenstrukturanalysen von 8 und 17A werden diskutiert. - Beim Behandeln der Steroidester 17A bzw. 19/2 mit wässriger Natronlauge in Ethanol entstehen zuerst durch E2-Eliminierung die 6-Methylidencarbonsäure-methylester 22, bzw. durch Umesterung der entsprechende Ethylester 24. Darauf folgt die Hydrolyse zu den entsprechenden ungesättigten Carbonsäuren 23 bzw. 25.

Die Synthese von künstlichen Antigenen durch Kupplung der genannten Steroidcarbonsäuren an Rinderserumalbumin wird nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt. Das aus 2 erhaltene Immunogen eignet sich für den Radioimmunoassay von 5α-Pregnan-3,20-dion.

UNIV. LIBRARY BRIL

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.	Einleitung	1
1.1.	Der Radioimmunoassay	1
1.2.	Die Synthese des künstlichen Antigens (Immunogens)	2
2.	Problemstellung	4
2.1.	Funktionalisierung von 4-En-3-ketosteroiden an C6 durch Bromierung	4
2.2.	Funktionalisierung von 4-En-3-ketosteroiden an C6 durch π-Allylpalladiumchloridkomplexe	5
2.3.	Kupplung von Steroidcarbonsäuren an Rinderserumalbumin	7
II.	SYNTHESE DER 4-THIOENOLETHERCARBONSÄURE-DERIVATE VON PROGESTERON UND TESTOSTERON	8
1.	Synthese von 6β-Bromprogesteron 1 und 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4	10
1.1.	Die allylische Bromierung mit N-Bromsuccinimid (Wohl-Ziegler-Bromierung) von 4-En-3-ketosteroiden	10
1.2.	Die spektroskopische Untersuchung der 6β-Bromderivate 4, 1 und 5	14
1.2.1.	Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6β-Brom-THP-Testosteron 4	14
1.2.2.	Die ^{13}C-NMR-Spektren von 6β-Bromprogesteron 1 und 6β-Brom-THP-Testosteron 4	15
1.2.3.	Das CD-Spektrum von 4	19

2.	Die Tetrahydro-2-pyranyl-(THP)-Schutzgruppe	20
2.1.	Blockierung und Deblockierung bei der THP-Schutzgruppe	20
2.2.	Die spektroskopische Untersuchung der THP-Derivate 3, 4 und 6	21
2.2.1.	Das ^{1}H-NMR-Spektrum von THP-Testosteron 3	21
2.2.2.	Das ^{13}C-NMR-Spektrum von THP-Testosteron 3	23
2.2.3.	Das Produktverhältnis der beiden Diastereomeren bei den Reaktionsstufen der THP-Derivate	26
2.2.4.	Die Felddesorptionsmassenspektren (FD-MS) der THP-Testosteronderivate 3, 4 und 6	27
3.	Synthese der 4-S-Carboxyethylthioenolether-Derivate von Progesteron 2 und von THP-Testosteron 6 und von Testosteron 7	29
3.1.	Die Reaktion der 6β-Brom-4-en-3-ketosteroide mit 3-Mercaptopropionsäure	29
3.2.	Die spektroskopische Untersuchung von 7 bzw. 6 und 2 (Beweis für die Umlagerung)	31
3.2.1.	Die ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren	31
3.2.2.	Das UV-Spektrum von 7	42
3.2.3.	Das CD-Spektrum von 7	43
3.2.4.	Die IR-Spektren von 6 und 7	46
3.2.5.	Die Felddesorptionsmassenspektren der Thioenolethercarbonsäurederivate von THP-Testosteron 6 und Testosteron 7	47
3.3.	Reaktionsmechanismus der Allylumlagerung	48
III.	DIE SYNTHESE DER 6-METHYLIDENCARBONSÄURE-DERIVATE VON TESTOSTERON UND PROGESTERON	51
1.	Die Synthese der π-Allylpalladiumhalogenidkomplexe von Testosteron und Progesteron	51
1.1.	Allgemeine Darstellungsmethoden für π-Allylpalladiumchloridkomplexe	51

1.2. Die Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8 und von Bis(3,20-Dioxopregnen-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 9 51

1.3. Der Reaktionsmechanismus der π-Allylpalladiumchloridkomplexbildung 54

1.3.1. Der Mechanismus der Komplexbildung bei der Reaktion im sauren Milieu 54

1.3.2. Der Mechanismus und die Stereochemie der Komplexbildung bei 4-En-3-ketosteroiden im schwach basischen Milieu 55

1.4. Die Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η)α-ylpalladiumbromid) 10, -jodid 11, -thiocyanat 12, -chlorid-pyridin 13 und -chlorid-triphenylphosphin 14 57

1.5. Die spektroskopische Untersuchung der π-Allylpalladiumkomplexe von Testosteron und Progesteron 8, 9, 10, 11, 12 und 13 59

1.5.1. Die FD-Massenspektren der π-Allylpalladiumhalogenidkomplexe 8, 9, 10 und 11 59

1.5.2. Die CD- und UV/VIS-Spektren der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 8, 10, 11, 12 und 13 63

1.5.3. Die ^{13}C-NMR-Spektren der π-Allylpalladiumkomplexe von Testosteron und Progesteron 8, 8a, 9, 10, 11, 13 und die ^{1}H-NMR-Spektren von 8, 11 und 13 69

1.6. Die Röntgenstrukturanalyse von Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid 8 82

1.6.1. Kristallzüchtung und Kristalldaten 82

1.6.2. Die Diskussion der Molekül- und Kristallstruktur von 8 89

2.	Die Synthese des 6β-Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivates vom Testosteron 17A und des 6β-Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivats von Progesteron 19/1 und analoger Derivate	99
2.1.	Allgemeine Bedingungen für die allylische Alkylierung von π-Allylpalladiumchloridkomplexen	99
2.2.	Der Reaktionsmechanismus der allylischen Alkylierung	102
2.3.	Die Reaktionsbedingungen für die allylische Alkylierung der π-Allylpalladiumchloridkomplexe von Testosteron 8 und von Progesteron 9 mit CH-aciden Estern	103
2.4.	Testosteron-6β-yl-cyanessigsäuremethylester 16 und Progesteron-6β-yl-cyanessigsäuremethylester 15	106
2.5.	Testosteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 20 und Progesteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 21	107
2.6.	Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A und das Stereoisomere 17B	109
2.6.1.	Die chromatographische Trennung der Stereoisomeren 17A und 17B	111
2.6.2.	Die FD-Massenspektren	112
2.6.3.	Die Drehwerte und die Konfiguration an C6 und C-a	114
2.6.4.	Die CD-Spektren	115
2.6.5.	Die IR-Spektren	116
2.6.6.	Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren	117
2.7.	Testosteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 18/2 und das Nebenprodukt Androst-4-en-3,17-dion 18/1	125

2.8.	Progesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäure-methylester 19/2 und das Nebenprodukt Iso-progesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäure-methylester 19/1	129
2.8.1.	Die chromatographische Trennung der 17α- und 17β-Epimeren	129
2.8.2.	Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren	129
2.8.3.	Die CD-Spektren	133
2.8.4.	Die Schmelzpunkte und Drehwerte	135
2.9.	Die ^{13}C-NMR-Spektren der 6β-substituierten Testosteron- und Progesteronderivate	137
2.10.	Die CD-Spektren der 6β-substituierten Testosteron- und Progesteronderivate	145
2.10.1.	Der n → π^*-Übergang	145
2.10.2.	Der π → π^*-Übergang	156
2.11.	Die 4,6-Dien-3-ketosteroide als Nebenprodukte bei der allylischen Alkylierung	162
2.12.	Die Synthese der CH-aciden Ester Phenyl-sulfonylessigsäuremethylester und Methyl-sulfonylessigsäuremethylester	165
2.12.1.	Verschiedene Synthesewege	165
2.12.2.	Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren	170
2.13.	Die Röntgenstrukturanalyse von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A	170
2.13.1.	Kristalldaten und Datensammlungsparameter	171
2.13.2.	Die Konformation des Substituenten an C6	176
2.13.3.	Die Konformation des A-Ringes	178
2.13.4.	Die Konformation des B-Ringes	183
2.13.5.	Die Konformation des C-Ringes	184
2.13.6.	Die Konformation des D-Ringes	185
2.13.7.	Die Gesamtmolekülkonformation	187
2.13.8.	Die Kristallstruktur von 17A	189

3.	Synthese der 6-Methylidencarbonsäurederivate von Testosteron und Progesteron	192
3.1.	Die Spaltung der Steroidmethylester durch Halolyse	192
3.1.1.	Die Halolyse von 17A	193
3.2.	Die Spaltung der Steroidmethylester durch Ethanolyse	194
3.2.1.	Die Ethanolyse von 17A	195
3.3.	Die Spaltung der Steroidmethylester 17A und 19/2 durch Alkalibehandlung bei Raumtemperatur. Synthese von Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23 und von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25	198
3.4.	Die spektroskopische Untersuchung von 23 und 25	199
3.4.1.	Die Massenspektren	199
3.4.2.	Die UV-Spektren	200
3.4.3.	Die ^{1}H-NMR-Spektren	200
3.4.4.	Die ^{13}C-NMR-Spektren	201
3.4.5.	Das IR-Spektrum von 25	206
3.4.6.	Die CD-Spektren	207
3.5.	Die Untersuchung der Eliminierung/Hydrolyse-Reaktion	210
3.5.1.	Die HPLC-Untersuchung der Zwischenprodukte 22 bzw. 24 und des Methylesters 22 und 26	210
3.5.2.	Die MS- und ^{1}H-NMR-Spektren von 24 und 26	214
3.5.3.	Das 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 26	218
3.6.	Der Mechanismus der Eliminierung und Hydrolyse	221

IV.	DIE SYNTHESE DER KÜNSTLICHEN ANTIGENE	224
1.	Das Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat und das Testosteron-6-methylidencarbonsäure(23)-Rinderserumalbumin-Konjugat	224
1.1.	Die Kupplung der Steroidcarbonsäuren 2 und 23 an Rinderserumalbumin	224
1.2.	Die Analyse der Konjugate	227
1.3.	Der Radioimmunoassay von 5α-Pregnan-3,20-dion mit einem Antiserum gegen Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat	230
V.	EXPERIMENTELLER TEIL	240
1.	Chemikalien	240
2.	Chromatographische Methoden	241
2.1.	Dünnschichtchromatographie	241
2.2.	Präparative Schichtchromatographie	241
2.3.	Trockensäulenchromatographie	242
2.4.	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie	243
2.5.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	243
3.	Spektroskopische Methoden	244
3.1.	Kernresonanzspektroskopie	244
3.2.	Massenspektrometrie	245
3.3.	Infrarotspektroskopie	245
3.4.	Elektronenanregungsspektroskopie	246
3.5.	Circulardichroismusspektroskopie	246
3.6.	Drehwerte	246
4.	Sonstige Methoden	247
4.1.	Schmelzpunktbestimmung	247
4.2.	Feindestillation	247
4.3.	pH-Messungen	247
4.4.	Dialyse	247
4.5.	Gefriertrocknung	247

5.	Arbeitsvorschriften	248
5.1.	6β-Brom-pregn-4-en-3,20-dion 1	248
5.2.	3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4-ylmercapto)-propionsäure 2	248
5.3.	17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 3	249
5.4.1.	6β-Brom-17β(tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 4	250
5.4.2.	Alternative Darstellung von 6β-Brom-17β-(tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 4 zur Gewinnung des Nebenprodukts 6β-Brom-17β-hydroxyandrost-4-en-3-on 5	251
5.5.	3-(17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)-3-oxo-androst-4-en-4ylmercapto)propionsäure 6	251
5.6.	3-(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-4-ylmercapto)propionsäure 7 (Abspaltung der THP-Schutzgruppe nach Lit.[13])	252
5.7.1.	Versuch zur Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8 aus Dibenzonitrilpalladiumchlorid	253
5.7.2.	Dibenzonitrilpalladiumchlorid	253
5.8.	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung von π-Allylpalladiumchlorid-komplexen aus 4-En-3-ketosteroiden	254
5.8.1.	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8	254
5.8.2.	Bis(3,20-Dioxopregnen(4-6η)α-ylpalladium-chlorid 9	255
5.9.	Allgemeine Arbeitsvorschrift für den Halogen- bzw. Pseudohalogenaustausch beim Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex 8	255
5.9.1.	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumbromid) 10	255
5.9.2.	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumjodid) 11	256

5.9.3.	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6$_\eta$)α-ylpalladiumthiocyanat) 12	256
5.10.	Monomere Testosteron-π-allylpalladium-chloridkomplexe durch Behandlung des dimeren Komplexes 8 mit Basen	257
5.10.1.	17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6$_\eta$)α-ylpalladiumchlorid-pyridin 13	257
5.10.2.	17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6$_\eta$)α-ylpalladiumchlorid-triphenylphosphin 14	258
5.11.	Phenylsulfonylessigsäure aus Phenylmercapto-essigsäure	258
5.12.	Phenylsulfonylessigsäuremethylester (Methode der extraktiven Veresterung)	259
5.13.	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Methylestern aus Nitrilen	260
5.13.1.	Phenylsulfonylessigsäuremethylester aus Phenylsulfonylacetonitril	260
5.13.2.	Methylsulfonylessigsäuremethylester aus Methylsulfonylacetonitril	261
5.14.	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die allylische Alkylierung von π-Allylpalladium-chloridkomplexen von 4-En-3-ketosteroiden	261
5.14.1.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(cyan)essig-säure-methylester 15/1+2	262
5.14.2.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(cyan)-essigsäure-methylester 16/1+2	263
5.14.3.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(phenylsulfonyl)essigsäure-methylester 17A und das Stereoisomere 17B	263
5.14.4.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester 18/2 und das Nebenprodukt (3,17-Dioxoandrost-4-en-6β-yl)-(methylsulfonyl)essigsäure-methylester 18/1	265
5.14.5.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)-essigsäure-methylester 19/2 und das analoge 17α-Derivate 19/1	267

5.14.6.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)-malonsäure-dimethylester 20	268
5.14.7.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)malonsäure-dimethylester 21	269
5.15.	Spaltung des Testosteroncarbonsäureester-derivats 17A durch Halolyse (Lithiumjodid/ Pyridin bzw. 2,6-Lutidin)	270
5.15.1.	Darstellung von wasserfreiem Lithiumjodid	270
5.15.2.	Halolyse von Testosteron-6β-phenylsulfonyl-essigsäure-methylester 17A	270
5.16.	Spaltung des Testosteroncarbonsäureester-derivats 17A durch Ethanolyse (KOH/EtOH abs.)	271
5.17.	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Spaltung der Testosteron- und Progesteroncarbonsäure-derivate 17A und 19/1 durch alkalische Hydrolyse ($NaOH/H_2O$/Ethanol)	272
5.17.1.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)-carbonsäure 23	272
5.17.2.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbon-säure 25	273
5.17.3.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbon-säure-ethylester 24 als Zwischenprodukt aus der alkalischen Partialhydrolyse von 19/2	273
5.18.	Veresterung der Testosteron- und Progesteron-carbonsäurederivate 23 und 25 mit Diazomethan für die HPLC-Untersuchung	274
5.18.1.	(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)-carbonsäure-methylester 22 und (3,20-Dioxo-pregn-4-en-6-methyliden)carbonsäure-methyl-ester 26	274
5.18.2.	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbon-säure-methylester 26	275
5.19.	3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4-ylmercapto)propion-säure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat nach der Carbodiimidmethode	276

5.20. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)-carbonsäure(23)-Rinderserumalbumin-Konjugat nach der Carbonyldiimidazolmethode 276

5.21. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Progesteron- und Testosteron-carbonsäure-Rinderserumalbumin-Konjugate nach der Anhydrid-Methode 277

5.21.1. 3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4-ylmercapto)propionsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat 277

5.21.2. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)-carbonsäure (23)-Rinderserumalbumin-Konjugat 278

VI. ZUSAMMENFASSUNG 279

VII. LITERATURVERZEICHNIS 286

ABKÜRZUNGEN

CD	Circulardichroismus
CE	Cottoneffekt
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
ε	Molarer Extinktionskoeffizient (UV)
EtOH	Ethanol
FD-MS	Felddesorptionsmassenspektrometrie
IR	Infrarot
λ	Wellenlänge in Nanometer
MeOH	Methanol
MS	Elektronenstoßmassenspektrometrie
NBS	N-Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
θ	Molare Elliptizität (CD)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
UV/VIS	Elektronenanregungsspektroskopie im ultravioletten bzw. sichtbaren Bereich

s	Singulett
d	Dublett
t	Triplett
m	Multiplett

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1. Einleitung

1.1. Der Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay[1-3] ist eine hochempfindliche Analysenmethode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen in Gegenwart eines großen Überschusses von Fremdstoffen. Große Bedeutung hat dieser Test für die Analytik in Medizin, Pharmakologie, Toxikologie und beim Umweltschutz erlangt. Er dient vor allem zur Bestimmung von Hormonen, wie Peptid-, Steroid-, Schilddrüsenhormonen und Prostaglandinen, außerdem von Enzymen, Serumproteinen, Vitaminen, Tumorantigenen, Arzneimitteln und Pflanzenschutzmittelrückständen in den verschiedensten biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Plasma, Serum oder Urin. Diese Stoffe, die in kleinsten Mengen größte biologische Wirkungen entfalten, können oft ohne vorherige Abtrennung oder Anreicherung in Nanogramm- oder Picogrammmengen bestimmt werden, da bei dieser Methode die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiver markierter Verbindungen und die hohe Spezifität immunologischer Reaktionen miteinander verknüpft werden. Voraussetzung für den Aufbau eines Radioimmunoassays ist die radioaktive Markierung der Substanz, für die der Test durchgeführt werden soll, und die Erzeugung von Antikörpern gegen diesen Stoff. Für den Test selbst werden nur etwa 10 nCi Radioaktivität je Probe und eine geringe Menge verdünntes Antiserum benötigt.

Der Radioimmonoassay, der auf der Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes beruht, läßt sich als kompetitive Proteinbindungsanalyse verstehen. Eine variable Menge der zu bestimmenden Substanz, z.B. eines Steroidhormons und eine konstante Menge derselben radioaktiv markierten Verbindung konkurrieren um eine begrenzte, ebenfalls konstante Zahl von Bindungsplätzen am Antikörpermolekül. Es stellt sich ein charakteristisches Antigen-Antikörpergleichgewicht ein.

Vom Antikörper werden umso weniger radioaktiv markierte Moleküle gebunden, je mehr unmarkierte vorhanden sind. Gebundene und ungebundene Radioaktivität müssen getrennt werden. Das kann z.B. durch ein Aktivkohle-Dextrangemisch geschehen, an das das freie Hormon adsorbiert wird. Aus der Messung der Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes kann mittels einer Eichkurve das ursprünglich vorhandene Hormon quantitativ bestimmt werden.

1.2. Die Synthese des künstlichen Antigens (Immunogens)

Das wichtigste Kriterium für die Genauigkeit eines radioimmunologischen Tests ist die Spezifität der verwendeten Antikörper. Diese wird neben biologischen Faktoren vor allem durch das zur Immunisierung eingesetzte Antigen bestimmt. Da niedermolekulare Verbindungen normalerweise nicht immunogen sind, müssen sie zuvor an einen makromolekularen Träger, im allgemeinen an ein selbst schom immunogenes Protein, z.B. Rinderserumalbumin, gebunden werden.

Bei dieser Synthese eines künstlichen Antigens, wird das Hapten meistens über eine Carboxylgruppe peptidartig mit den freien Aminogruppen der Lysinreste des Trägerproteins verknüpft. Falls die Carboxylgruppe nicht schon im Molekül vorhanden ist, wie z.B. bei den Peptidhormonen und den Prostaglandinen, muß sie mittels eines bifunktionelles Reagenzes in das Hapten eingeführt werden.

Bei den Steroidhormonen, speziell auch bei den 4-En-3-ketosteroiden[1-5], die in dieser Arbeit ausschließlich behandelt werden, ergeben sich dabei zwei prinzipiell verschiedene Möglichkeiten:

1. Eine der im Molekül schon vorhandenen funktionellen Gruppen dient als Anker für das bifunktionelle Reagens.

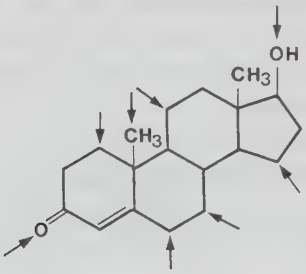
2. Eine neue funktionelle Gruppe wird in das alicyclische Grundgerüst oder in eine der beiden CH_3-Gruppen eingeführt und dient dann gleichermaßen als Verknüpfungsstelle für das bifunktionelle Reagens.

Im ersten Fall kommt hierfür hauptsächlich die Hydroxyl- oder die Oxofunktion infrage. In der Praxis haben sich vor allem zwei bifunktionelle Reagentien zur Einführung der Carboxylfunktion vielfach bewährt. Die OH-Gruppe wird mit Bernsteinsäureanhydrid zum Bernsteinsäurehalbester verestert. Die Ketogruppe wird mit O-Carboxymethylhydroxylamin zum O-Carboxymethyloxim umgesetzt. Auch die Reaktion der Ketogruppe mit 4-Hydrazinobenzoesäure zum Hydrazon ist schon beschrieben worden[6].

Da bei gleichem Grundgerüst der chemische Charakter eines Steroids und damit seine biologische Spezifität durch seine funktionellen Gruppen bestimmt wird, sollten diese bei der Synthese eines künstlichen Antigens möglichst erhalten bleiben. Werden sie wie im ersten Fall zur Haptensynthese herangezogen, sinkt damit auch die Spezifität des vom Antigen im tierischen Organismus erzeugten Antikörpers. Beim Radioimmunoassay sind dann vermehrt Kreuzreaktionen mit verwandten Steroiden zu erwarten. Das bedeutet, daß das zu bestimmende Steroid vor dem Test chromatographisch von den anderen Hormonen abgetrennt werden muß.

Aus diesem Grund wird möglichst der zweite Weg beschritten. Hier kann eine Neueinführung der Sauerstoffunktion durch chemische Oxydation[7] oder mikrobiologische Hydroxylierung[8] erfolgen. Auch Halogen- oder Epoxidderivate sind als Ausgangsstoffe für die Haptensynthese geeignet. Zusätzliche Doppelbindungen können durch enzymatische Dehydrierung[8] oder durch Halogenierung, gefolgt von Dehydrohalogenierung eingeführt werden.

In der folgenden Abbildung sind beim Testosteron die bisher aus der Literatur bekannten Angriffspunkte für bifunktionelle Reagentien und damit die Verknüpfungsstellen mit Rinderserumalbumin durch Pfeile angezeigt.



2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen ausschließlich die 4-En-3-ketosteroide Testosteron und Progesteron in der Allylstellung, also an C6, funktionalisiert werden.

2.1. Funktionalisierung von 4-En-3-ketosteroiden an C6 durch Bromierung

Durch radikalische Substitution kann hier der Bromrest[9] eingeführt werden. Als Hauptprodukt entsteht dabei das instabile 6β-substituierte Derivat, bei dem das Brom axial angeordnet ist. Dieses reaktive 6β-Bromderivat kann daher leicht mit dem Dianion einer Mercaptoalkansäure unter Bildung einer C-S-Verknüpfung zur Reaktion gebracht werden. Aus dem 6β-Bromderivat läßt sich aber auch zuerst Bromwasserstoff eliminieren. An die neu entstandene C6-C7-Doppelbindung kann dann das Dianion der Mercaptoalkansäure nukleophil addiert werden. Es entsteht dabei das 7α-Thioethercarbonsäurederivat. Während Lindner und Mitarbeiter[10] eine Reihe

von 7α-Thioethercarbonsäurederivaten synthetisierten, berichtete die gleiche Gruppe nur über die Snythese eines einzigen 6-Thioethercarbonsäurederivates, nämlich des unter basisch-protischen Bedingungen dargestellten Progersteron-6-carboxymethylthioethers[11].

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit[12] hatten sich aber Probleme bei der Synthese des analogen C6-substituierten Testosteronderivates ergeben. Besonders die basisch katalysierte Abspaltung der Acetylschutzgruppe aus dem Endprodukt bereitete Schwierigkeiten.

In der vorliegenden Arbeit wird daher die vierstufige Synthese zum vermeintlich 6-substituierten Carbonsäurederivat unter geänderter Strategie wiederholt (siehe Teil II). Zum Schutz der sekundären 17β-OH-Gruppe des Testosterons bei der radikalischen Bromierung wird jetzt die Tetrahydropyranylschutzgruppe[13] verwendet. Da sie acetalisch gebunden ist, verläuft die hydrolytische Abspaltung unter sauren Bedingungen. Die Reaktion des reinen 6β-Bromderivates mit 3-Mercaptopropionsäure wird unter S_N2-Bedingungen also in dipolar aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Reaktionsprodukte werden vor allem durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie genau charakterisiert. Auch das analoge Progesteronderivat wird in einer zweistufigen Synthese dargestellt.

2.2. Funktionalisierung von 4-En-3-ketosteroiden an C6 durch π-Allylpalladiumchloridkomplexe

Im darauf folgenden Teil III dieser Arbeit wird ein in der Literatur beschriebener interessanter Weg zu C6-substituierten CC-verknüpften 4-En-3-ketosteroiden aufgegriffen. Hierbei wird die Allylstellung durch Bildung der π-Allylpalladiumchloridkomplexe so aktiviert, daß sie mit weichen nukleophilen Agentien alkyliert werden kann. So berichten

Collins, Jackson und Timms[14,15] über die Synthese von 6β-Malonsäurederivaten aus den π-Allylpalladiumchloridkomplexen von Cholest-4-en-3-on, Testosteron und Progesteron durch Reaktion mit dem Natriumsalz des Malonsäuremethyl- oder -ethylesters. Aus diesen lassen sich durch Decarboalkoxylierung mit Lithiumjodid in trockenen Dimethylformamid die 6β-Essigsäureesterderivate darstellten. Allerdings entstehen dabei gleichzeitig größere Mengen der 6α-Isomeren.

Die Ergebnisse der Arbeiten von Collins, Jackson und Timms führten zu Überlegungen wie man ein möglichst stereochemisch einheitliches Carboxylderivat synthetisieren könnte. Würde man den π-Allylpalladiumchloridkomplex von Testosteron bzw. Progesteron mit einer CH-aciden Verbindung reagieren lassen, die nur eine Esterfunktion hat, müßte wie beim Malonester ebenfalls das stereochemisch einheitliche 6β-Derivat entstehen. Die Umwandlung des Esters in die Carbonsäure könnte dann durch alkalische Hydrolyse[16] oder Behandeln mit Natriummethylat in Methanol[17] oder mit Kaliumhydroxid in Methanol[18] oder durch Halolyse[19] erfolgen. Bei der basischen Hydrolyse oder Methanolyse muß allerdings mit einer zumindest teilweisen Umwandlung des 6β-Substituenten in das 6α-Isomere gerechnet werden[20]. Bei der von Taschner und Liberek eingeführten Halolyse[21] wird der Ester mit wasserfreien Lithiumjodid mehrere Stunden in Pyridin oder einem analogen Lösungsmittel unter Rückfluß gekocht. Eschenmoser und Mitarbeitern[19] gelingt mit dieser Methode die Spaltung von Steroidmethylestern, ohne daß gleichzeitig im Molekül vorhandene Acetylester gespalten werden. Auch hier sind Nebenreaktionen zu erwarten, da Erhitzen mit den genannten Basen die klassische Reaktionsbedingung für eine β-Eliminierung ist. Ein Vorteil dieser Strategie wäre, daß man auch im Falle des Testosterons mit einer dreistufigen Synthese zum Ziel käme, da hierbei die OH-Gruppe des Testosterons nicht geschützt werden müßte. Das bedeutet die Einsparung von zwei Reaktionsstufen.

Der Teil III dieser Arbeit befaßt sich daher mit der Synthese und Struktur der π-Allylpalladiumhalogenidkomplexe von Testosteron und Progesteron und den daraus synthetisierten 6β-substituierten Carbonsäureesterderivaten. Diese werden hauptsächlich durch Einsetzen von Phenyl- und Methylsulfonylessigsäuremethylester[22)] zur allylischen Alkylierung erhalten. Anschließend wird über die Umwandlung der Estergruppe in die Carboxylgruppe und die dabei entstehenden Steroidderivate berichtet. Zur Bestimmung der Struktur und Stereochemie dieser Reaktionsprodukte werden nicht nur alle wichtigen spektroskopischen Methoden wie Felddesorption- und Elektronenstoßmassenspektroskopie, Ultraviolettspektroskopie und Circulardichroismus, sowie ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie, sondern bei zwei Reaktionsprodukten auch die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt.

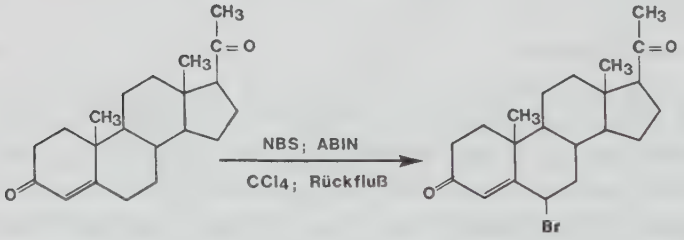
2.3. Kupplung von Steroidcarbonsäuren an Rinderserumalbumin

In Teil IV dieser Arbeit sollen die in der Literatur bekannten Kupplungsmethoden von Steroidcarbonsäuren an Rinderserumalbumin miteinander verglichen werden[1)]. Es soll zunächst untersucht werden, mit welcher der drei gebräuchlichen Methoden (Carbodiimid-, Imidazolid- oder Anhydrid-Methode) bei den hier synthetisierten Steroidcarbonsäuren die maximale Zahl der Mole gebundener Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin im künstlichen Antigen (Immunogen) erhalten wird. Bei den später in anderem Rahmen durchzuführenden immunologischen Untersuchungen kann dann festgestellt werden, ob diese Zahl die Potenz und Spezifität des gebildeten Antiserums beeinflußt.

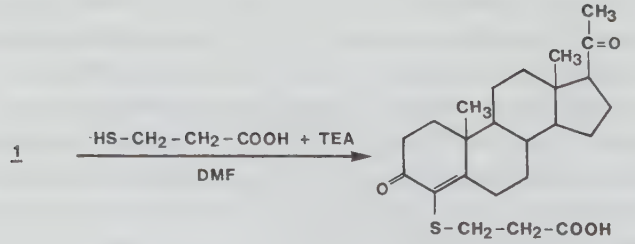
II. SYNTHESE DER 4-THIOENOLETHERCARBONSÄUREDERIVATE VON PROGESTERON UND TESTOSTERON

In diesem Teil der Arbeit wird über die zweistufige Synthese des Progesteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolethers und die vierstufige Synthese des analogen Testosteronderivates berichtet. Beide Produkte bilden sich aus den 6β-Brom-4-en-3-ketosteroiden nach Reaktion mit 3-Mercaptopropionsäure durch Allylumlagerung und anschließende Rückbildung des 4-En-3-on-Systems.

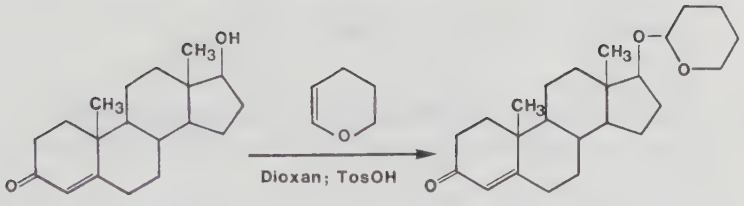
Die Synthesen laufen nach folgenden Reaktionsgleichungen ab:



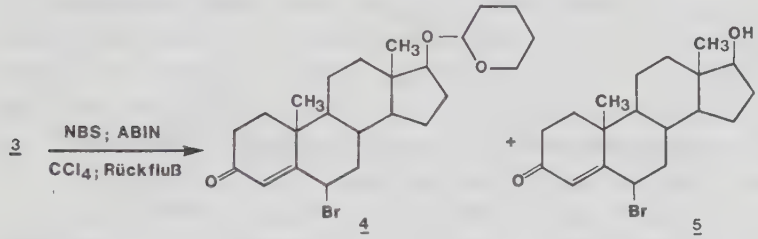
1

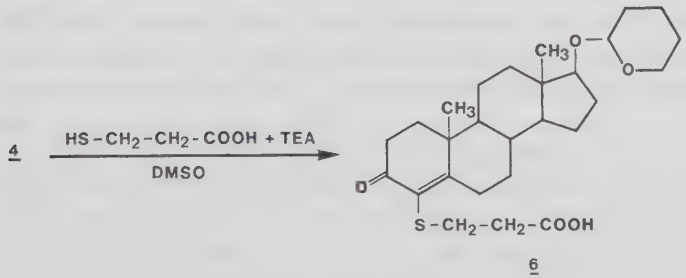


2

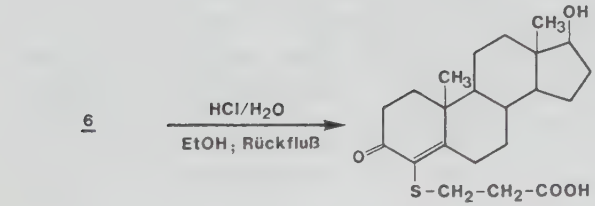

CH3
OH
CH3
O
Dioxan; TosOH
CH3
O
O

3


3
NBS; ABIN
CCl4; Rückfluß
CH3
O
O
Br
4
+
CH3
OH
Br
5


4
HS-CH2-CH2-COOH + TEA
DMSO
CH3
O
O
S-CH2-CH2-COOH

6


6
HCl/H2O
EtOH; Rückfluß
CH3
OH
O
S-CH2-CH2-COOH

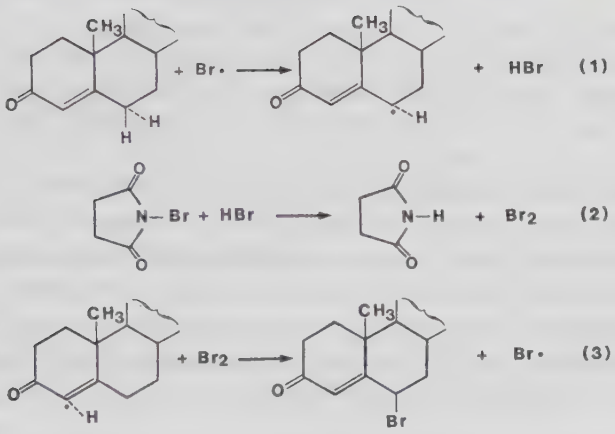
7

1. Synthese von 6β-Bromprogesteron 1 und 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4

1.1. Die allylische Bromierung mit N-Bromsuccinimid (Wohl-Ziegler-Bromierung) von 4-En-3-ketosteroiden

Die Bromierung von Steroidketonen und besonders 4-En-3-ketosteroiden ist schon seit Mitte der 30er Jahre Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Besonders die Arbeitsgruppen von Butenandt, Ruzicka, Inhoffen, Djerassi und Fieser haben sich besonders erfolgreich daran beteiligt[23]. Das Fernziel dieser Untersuchungen war, durch HBr-Eliminierung zwei Doppelbindungen in den A-Ring einzuführen und so schließlich aus einem Androgen eine Verbindung von Östrogen-Typ mit aromatischem A-Ring zu erhalten. Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der Steroidderivate stand damals neben der Schmelzpunkt- und Drehwertmessung nur die IR- und vor allem die UV-Spektroskopie zur Verfügung.

6β-Bromcholestenon wurde erstmals durch Umwandlung von Cholestenon mit Acetylchlorid/Acetanhydrid in das Enolacetat und dessen Bromierung in Ether/Essigsäure/Kaliumacetat dargestellt[24]. Später fand man, daß sich andere 4-En-3-ketosteroide durch radikalische allylische Bromierung mit N-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff direkt in die 6β-Brom-Derivate überführen lassen[9]. Eine Methode die heute noch die Methode der Wahl ist[25]. Die Reaktion läuft nach folgendem Mechanismus ab[26,27]:



Die Reaktion mit N-Bromsuccinimid (NBS) wird durch ein Bromradikal eingeleitet, das sich aus NBS durch Thermolyse oder über einen Radikalstarter bildet. Als ersten Schritt zur Substitution greift das Bromradikal das allylische C-Atom an: Durch Wasserstoffabstraktion bildet sich Bromwasserstoff und das Allylradikal (1). Aus HBr und NBS entsteht molekulares Brom in niedriger stationärer Konzentration, weil NBS in Tetrachlorkohlenstoff schwer löslich ist (2). Im zweiten Schritt der Substitutionsreaktion wird das Allylyradikal unter Bildung des Allylbromids und eines Bromradikals angegriffen (3). Durch die geringe Konzentration von Brom im Reaktionsansatz wird eine ionische oder radikalische Bromaddition an die Doppelbindung verhindert.

Die NBS-Bromierung von 4-En-3-ketosteroiden muß mit großer Sorgfalt durchgeführt werden, da als Hauptprodukt das reaktive 6β-Bromderivat gebildet wird, dessen Bromsubstituent axial oberhalb der Steroidebene steht. Für die Bildung des axialen und damit thermodynamisch instabilen Produkts sind

stereoelektronische Einflüsse maßgebend: Das freie sp^3-Orbital an C6, das vom eintretenden Brom besetzt wird, überlappt mit dem π-Orbital das konjugierten Systems. In der Sesselform eines 6-gliedrigen Ringes ist eine solche Überlappung nur möglich, wenn das Orbital axial orientiert ist; es muß sich also ein axiales Produkt bilden[23].

In den Reaktionsansätzen findet sich fast immer auch noch das 6α-Brom-Derivat als Nebenprodukt. In diesem Epimeren liegt das Brom in der thermodynamisch stabileren äquatorialen Form vor. Durch Behandeln des 6β-Brom-Produkts mit Tetrachlorkohlenstoff bzw. Chloroform:Methanol = 9:1 bei Raumtemperatur kann die teilweise Umlagerung zum α-Epimeren mit 30 %iger Ausbeute bewirkt werden[28].

So werden bei der Reaktion mit NBS Ausbeute und Produktverhältnis durch mehrere Faktoren beeinflußt: einmal die Natur des eingesetzten 4-En-3-ketosteroids, d.h. seine Polarität, dann die Art des Radikalstarts, der wiederum die Reaktionszeit bestimmt, und letztlich die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes. So entsteht aus Testosteronacetat bei dem die polare OH-Gruppe durch Acetylierung in ein lipophileres Derivat umgewandelt wird, fast ausschließlich das 6β-Brom-Produkt in guter Ausbeute. Beim ungeschützten polaren Testosteron, das sich nur schlecht in Tetrachlorkohlenstoff löst, ist die Ausbeute an Bromierungsprodukt nur gering. Außerdem entsteht neben den 6β-Brom-Produkt ein erheblicher Teil des α-Brom-Epimeren[28]. Der Radikalstart kann allein thermisch d.h. durch bloßes Rückflußkochen[29] oder photolytisch[30] oder durch Zusatz von Radikalstartern, wie Benzoylperoxid[25,28] oder Azobisisobutyronitril[25,31] erfolgen. Nach Literaturangaben[30] ist bei der Belichtungsmethode zwar die Ausbeute hoch, es werden aber keine Angaben über das Verhältnis der α- und β-Epimeren gemacht. Beim ausschließlich thermischen Radikalstart oder beim Radikalstart mit Benzoylperoxid sind lange Reaktionszeiten

erforderlich, daher entsteht das thermodynamisch stabilere α-Produkt in beträchtlicher Menge[28].

In der vorliegenden Arbeit sind mit Azobisisobutyronitril bei kurzen Reaktionszeiten die besten Ergebnisse erzielt worden. Die Ausbeute an kristallinem Produkt hängt wesentlich von der Art der Aufarbeitung ab. Auswaschen der Tetrachlorkohelnstofflösung mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung zur Neutralisation von HBr und HOBr ist gegenüber der wasserfreien Aufarbeitung von Vorteil. In beiden Fällen muß das Rohprodukt anschließend in einem geeigneten Lösungsmittel durch Einengen der Lösung rasch zur Kristallisation gebracht und isoliert werden. Mutterlaugen werden selbst bei tiefer Temperatur nach kurzer Zeit tiefschwarz und unbrauchbar.

So kann bei der Synthese von 6β-Bromprogesteron die Ausbeute auf das Doppelte erhöht werden, wenn man bei der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes mit Natriumhydrogencarbonat wäscht und das Rohprodukt aus Ethylacetat kristallisiert, im Vergleich zu einem Reaktionsansatz bei dem wasserfrei aufgearbeitet und aus Ether kristallisiert wird.

Wie oben erwähnt, ist bei der Bromierung von Testosteron der Schutz der OH-Gruppe von Vorteil. Bei früheren Versuchen[12] wurde sie acetyliert. Die alkalische Abspaltung der Schutzgruppe aus dem mit 3-Mercaptopropionsäure entstanden Reaktionsprodukt war aber, was Ausbeute und Reinheit des desacetylierten Produkts anbelangt, sehr unbefriedigend, obwohl sich aus Testosteronacetat selbst die Schutzgruppe problemlos abspalten läßt. Da man jetzt weiß, daß ein seiner Natur nach alkalilabiles 4-Thioenoletherderivat vorliegt (s.u.), sind diese Schwierigkeiten verständlich. Bei der folgenden 4-stufigen Synthese wird daher die Tetrahydropyranylschutzgruppe, die in schwach saurem Milieu abgespalten wird, verwendet[13]. Da bei der Bromierung in Anwesenheit von Wasser-

spuren HBr und HOBr entstehen, wird während der Aufarbeitung von einem Teil des Produkts die Schutzgruppe wieder abgespalten. So konnte aus einem Reaktionsansatz bei dem die Säuren nicht durch Natriumhydrogencarbonatextraktion neutralisiert wurden, 6β-Bromtestosteron 5 als Nebenprodukt isoliert und durch ^{13}C-Spektroskopie identifiziert werden. Es fehlen die Signale der C-Atome des THP-Restes (s.u.); C17 hat den ppm-Wert von Testosteron; das für C6 erwartete Signal ist vorhanden (s.u.).

1.2. Die spektroskopische Untersuchung der 6β-Bromderivate 4, 1 und 5

1.2.1. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6β-Brom-THP-Testosteron 4

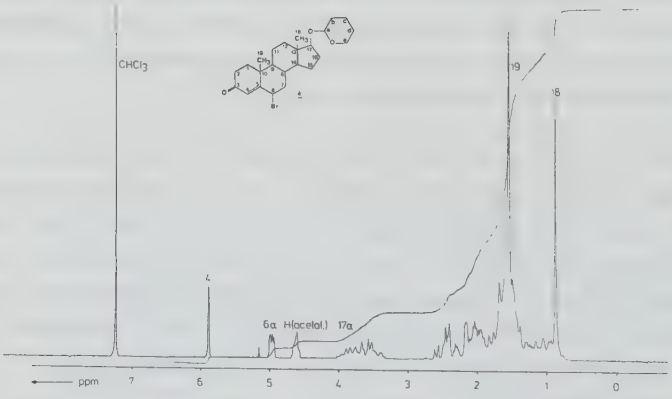


Abb. 1: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4 in $CDCl_3$

Das ^{1}H-Spektrum von 4 (siehe Abb. 1 und Tab. 4) zeigt die erwarteten Werte[32,33]: Tieffeldverschiebung von H6α, die chemische Verschiebung beträgt 4.94 ppm und die Signalaufspaltung zum Quartett durch Kopplung mit H7α und H7β. Die Summe der beiden Kopplungskonstanten beträgt 4.1 Hz.

Zur ausführlichen Diskussion der ^{1}H-Spektren von 6β-Brom 4-En-3-ketosteroiden sei auf die vorausgegangene Diplomarbeit hingewiesen[12]. In der Literatur wird das H6α-Signal im tiefen Feld entweder als X-Teil eines ABX-Systems[33] oder als M-Teil eines komplexen ABC-MX-Spin-Systems[34] beschrieben. H4 erscheint als Singulett, das beweist die β-Ständigkeit des Brom-Substituenten[35] (s.u.). Das Signal ist um 0.18 ppm tieffeldverschoben. Auch diese Verschiebung ist aus der Literatur bekannt[35] und ist analog zur Tieffeldverschiebung von C4 im ^{13}C-Spektrum (s.u.). Auch die Tieffeldverschiebung von H19 um 0.38 ppm ist seit langem bekannt[32,33] und wird unten bei den ^{13}C-NMR- und CD-Spektren der 6β-CC-verknüpften 4-En-3-ketosteroide diskutiert.

1.2.2. Die ^{13}C-NMR-Spektren von 6β-Bromprogesteron 1 und 6β-Brom-THP-Testosteron 4

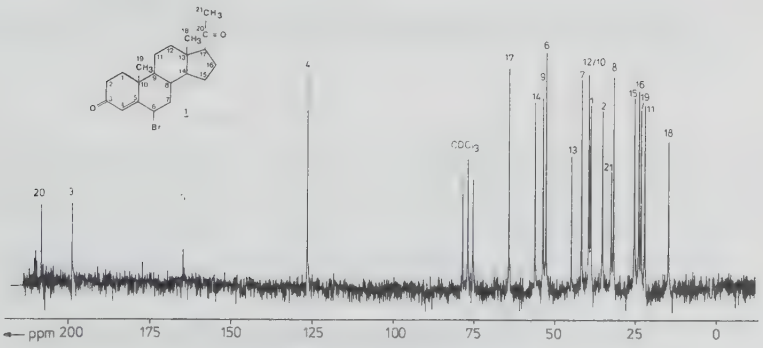


Abb. 2: ^{13}C-NMR-Spektrum von 6β-Bromprogesteron 1; protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz; ca. 120 mg in 1 ml $CDCl_3$; 5400 Pulsinterferogramme

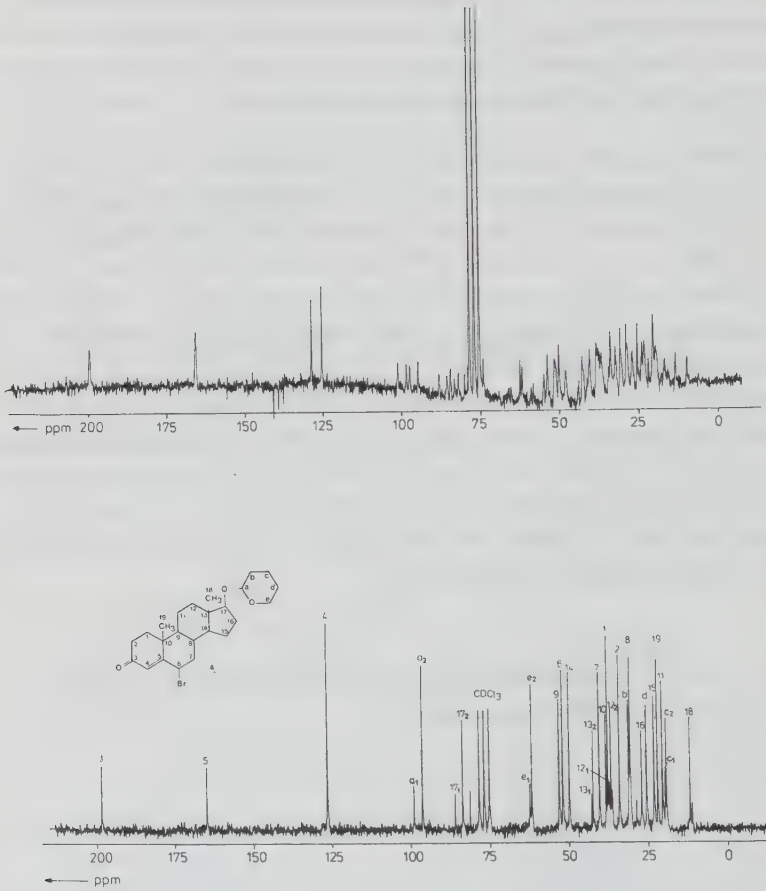


Abb. 3: ^{13}C-NMR-Spektren von 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4; je ca. 150 mg in 1 ml $CDCl_3$; 20.115 MHz

Oben: Off-resonance-Spektrum; 78726 Pulsinterferogramme

Unten: Protonenbreitbandentkoppeltes Spektrum; 8000 Pulsinterferogramme.

Die chemischen Verschiebungen von 1 und 4 sind aus Tab. 5 ersichtlich. In Tab. 1 werden die Verschiebungsinkremente des 6β-Brom-Derivates 1 mit denen von 6β-Fluor- und 6β-Chlor-4-en-3-ketosteroiden aus der Literatur[36] verglichen. Wegen dem Elektronenzug von Brom erfährt C6 eine Entschirmung und damit eine Verschiebung ins tiefe Feld. Die chemische Verschiebung von 1 beträgt 51.9 ppm, das Tieffeldverschiebungsinkrement ist mit +19.2 ppm geringer als bei 6β-Substitution mit den noch elektronegativeren Halogenen Fluor und Chlor. Auch die aus der Literatur bekannte elektronische Wechselwirkung der axialen Substituenten mit dem π-System, die sich in einer Tieffeldverschiebung von C4 auswirkt, wird bei 6β-Brom-Substitution bestätigt (+ 3.2 ppm bei 1). Die bekannte Hochfeldverschiebung von C8 ist unabhängig von der Art des 6β-Substituenten und dürfte durch 1,3-diaxiale Wechselwirkung mit H8β zustande kommen. Sie wird unten bei den 17α- und 17β-Derivaten 19/1 und 19/2 ausführlich diskutiert. Auch die für 6β-Substitution charakteristische Tieffeldverschiebung von C1 um +2.2 ppm wird hier bestätigt. Eine große Tieffeldverschiebung von C6 (geringe Elektronendichte) hat eine große Hochfeldverschiebung von C5 (größere Elektronendichte) zur Folge. Ob die stärkere Tieffeldverschiebung von C19 durch Halogene mit größerer Raumerfüllung auf Grund von 1,3-diaxialen Wechselwirkungen zustande kommt, wie allgemein angenommen wird, sollte neu diskutiert werden, da aus CD-Untersuchungen von 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden und den entsprechenden 19-nor-Steroiden bekannt ist, daß C19 bzw. H19 und der 6β-Substituent unabhängig voneinander mit dem Enonchromophor koppeln (s.u.). Außerdem könnte aus einer direkten Wechselwirkung eine Hochfeldverschiebung resultieren. Im Off-resonsance-Spektrum von 4 hat C4 ein Dublett, es ist also unsubstituiert. Darauf muß besonders hingewiesen werden, da beim nächsten Reaktionsschritt eine Allylumlagerung von C6 nach C4 diskutiert wird und es nach Literaturangaben[37]

möglich wäre, daß man bei der Bromierung mit N-Bromsuccinimid in Gegenwart eines Protonenakzeptors die 4-bromsubstituierten 4-En-3-ketosteroide erhält. Die analogen 4-Chlor-Derivate lassen sich unter ähnlichen Bedingungen erhalten[38]. Auch C6 zeigt im Off-resonance-Spektrum des 6β-Bromderivats 4 das erwartete Dublett.

Tab. 1: Die ^{13}C-Verschiebungsinkremente für die A- und B-Ring C-Atome von 6β-Bromprogesteron 1 im Vergleich mit den Verschiebungsinkrementen von 6β-Fluor- und 6β-Chlor-4-en-3-ketosteroiden nach Holland und Thomas[36]

C-Atom	6β-Fluor	6β-Chlor	6β-Brom (aus 1)
1	+ 1.5	+ 2.2	+ 2.2
2	+ 0.5	+ 0.4	+ 0.3
3	+ 0.7	+ 0.6	+ 0.3
4	+ 4.9	+ 3.9	+ 3.2
5	- 8.9	- 6.0	- 5.5
6	+60.8	+28.6	+19.2
7	+ 5.1	+ 8.0	+ 8.9
8	- 5.1	- 5.1	- 4.8
9	- 0.2	- 0.3	- 0.7
10	- 0.4	- 0.1	0.0
19	+ 1.3	+ 3.9	+ 4.9

1.2.3. Das CD-Spektrum von 4

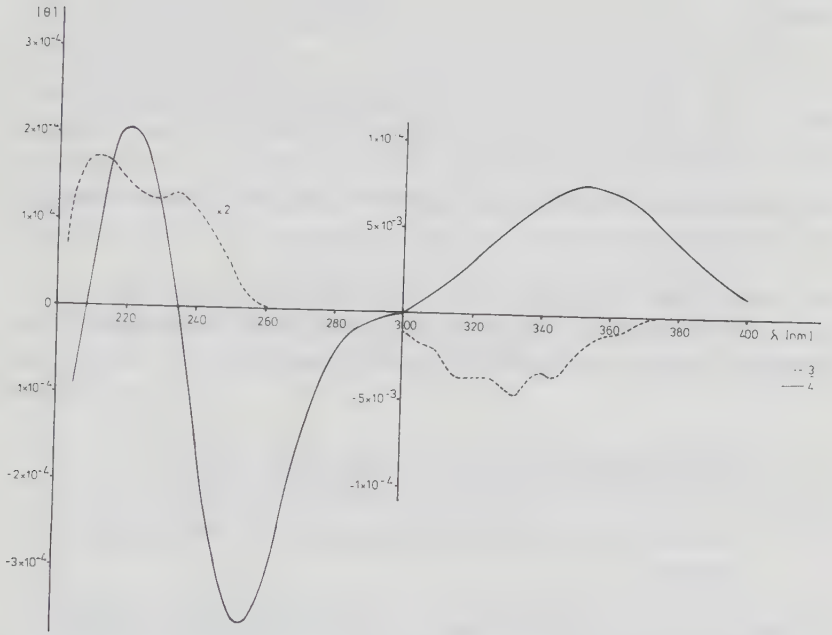


Abb. 4: CD-Spektren von 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)-testosteron 4 und von 17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)-testosteron 3; gemessen in Dioxan; Konzentration: $0.25 \cdot 10^{-2}$ Mol/l

n → π* Übergang

Der Cottoneffekt des n → π*-Übergangs (R-Bande) von 6β-Brom-THP-Testosteron 4 zeigt in Dioxan keine Feinstruktur und hat wie erwartet positives Vorzeichen[39]. Das Maximum liegt bei 352.5 nm und ist damit gegenüber dem intensivsten Minimum von THP-Testosteron 3 um 20 nm in den langwelligen Bereich verschoben.

$\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang

Der langwelligere $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang (K-Bande) bei 254 nm ist gegenüber dem UV-Maximum um 5 nm bathochrom verschoben und zeigt die erwartete Vorzeichen-Umkehr[40]. Der negative Cottoneffekt hat eine hohe molare Elliptizität. K- und R-Bande haben also entgegengesetzte Vorzeichen und zeigen damit "klassisches" CD-Verhalten.

Der energiereiche Übergang bei 222 nm hat das für 4-En-3-ketosteroide erwartete positive Vorzeichen[41].

Die Vorzeichenregeln für die Cottoneffekte im $n \rightarrow \pi^*$- und $\pi \rightarrow \pi^*$-Bereich von 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden werden unten ausführlich diskutiert.

2. Die Tetrahydro-2-pyranyl-(THP)-Schutzgruppe

2.1. Blockierung und Deblockierung bei der THP-Schutzgruppe

Da die Tetrahydropyranylgruppe ein asymmetrisches C-Atom enthält, werden beim Schutz von chiralen Alkoholen Diastereomerengemische gebildet[42,43]. Um diese Schwierigkeit zu umgehen kann man die symmetrische Methoxytetrahydropyranylschutzgruppe verwenden[44,45]. Durch den hohen Preis von 4-Methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran im Vergleich zu Dihydro-4H-pyran sind der Verwendung bei größeren präparativen Ansätzen Grenzen gesetzt. Auch bei der Reaktion von Testosteron mit seiner sekundären OH-Gruppe an C17 mit Dihydropyran entsteht das 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)-derivat als Diastereomerenpaar. Wegen der geringen Unterschiede der beiden Komponenten wird wohl eine präparative Trennung mit den heutigen chromatographischen Methoden kaum möglich sein.

Für die Blockierung und die Deblockierung haben sich die Arbeitsvorschriften für Steroidalkohole von Reese und Mit-

arbeitern[13] auch beim Testosteron bewährt. Für die Blockierung, d.h. Addition der sekundären 17β-OH-Gruppe an die Doppelbindung von Dihydro-4H-pyran unter Acetalbildung wird 4-Toluolsulfonsäure als Katalysator und wasser- und peroxidfreies Dioxan als Lösungsmittel verwendet. Die Deblockierung der Schutzgruppe wird am besten durch 30 Minuten langes Kochen unter Rückfluß in 10^{-3}n HCl in Ethanol erreicht. Diese doppelte Zeit im Vergleich zur Literaturangabe, ist für die vollständige Abspaltung des THP-Restes erforderlich.

Die in der Literatur[17,46,47] angegebene Abspaltung der THP-Schutzgruppe mit Eisessig:THF:H_2O = 3:1:1 bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten hat sich hier nicht bewährt.

2.2. Die spektroskopische Untersuchung der THP-Derivate 3, 4 und 6

2.2.1. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von THP-Testosteron 3

Das Diastereomerengemisch von THP-Testosteron 3 führt zu einem Doppelsignal von H18 im ^{1}H-NMR-Spektrum (0.79 und 0.81 ppm), da die C18-Methylgruppe in direkter Nachbarschaft zum Asymmetriezentrum steht. Das Multiplett bei 4.59 ppm wird dem acetalischen H-Atom H-a zugeordnet. Nach Literaturangaben[42] zeigt das acetalische H-Atom in 2'-O-Tetrahydropyranyluridin ein Multiplett bei 4.81 ppm. Ein Multiplett bei 3.81 ppm wird dem von H17α erwarteten Triplett zugeordnet. Das würde bedeuten, daß H17α, in Analogie zu C17 im ^{13}C-NMR-Spektrum, durch den eingeführten THP-Rest nur wenig tieffeldverschoben wird. Andererseits ist bekannt, daß bei Testosteronacetat H17α um etwa +1 ppm (von 3.6 nach 4.6 ppm) gegenüber Testosteron tieffeldverschoben ist[49].

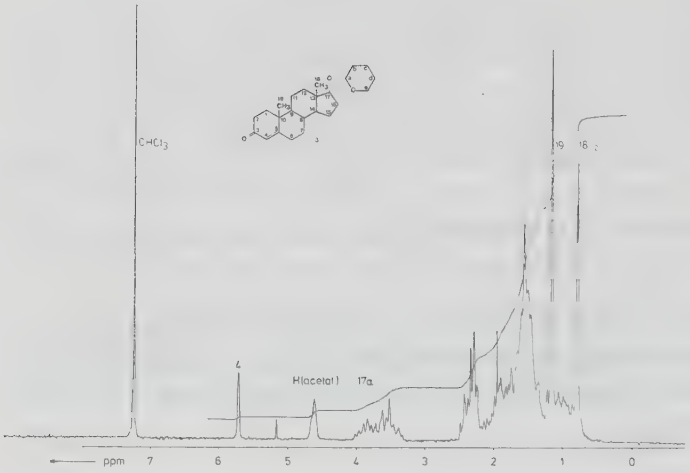


Abb. 5: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 3 in $CDCl_3$

Wäre das beim THP-Derivat auch der Fall, müßte die umgekehrte Zuordnung getroffen werden. Da aber auch im ^{13}C-NMR-Spektrum das acetalische C-Atom C-a stärker tieffeldverschoben ist als C17 und da das acetalische H-Atom im ^{1}H-NMR-Spektrum des deblockierten Derivates 7 fehlt, dürfte die getroffene Zuordnung (s. Tab. 4) die richtige sein.

2.2.2. Das ^{13}C-NMR-Spektrum von THP-Testosteron 3

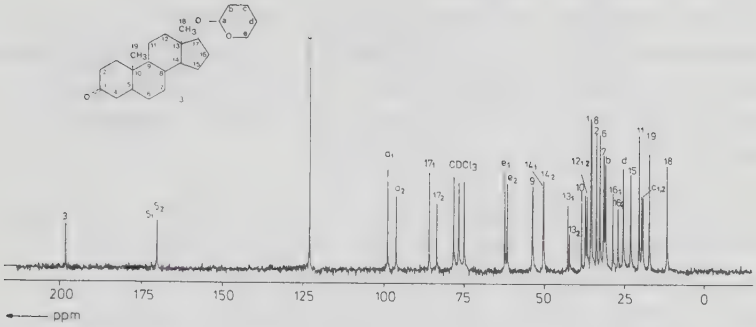


Abb. 6: ^{13}C-NMR-Spektrum von THP-Testosteron 3; Protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz ca. 150 mg in 1 ml $CDCl_3$; 11500 Pulsinterferogramme

Das ^{13}C-NMR-Spektrum von 3 zeigt 33 Signale. Da Testosteron 19 C-Atome und der THP-Rest fünf C-Atome hat, würde man 48 Signale erwarten, falls alle Signale doppelt vorhanden wären. Durch Vergleich des Spektrums von 3 mit den Spektren von Testosteron[88,113] und von 2-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)propan-1,2-diol, bei dem die Signale alle acht C-Atome doppelt vorhanden sind*), lassen sich die Signale, die zum THP-Rest gehören, von denen des Steroidrestes gut unterscheiden. Es zeigt sich, daß vom THP-Rest nur drei Signale doppelt vorhanden sind. Vom Steroidgerüst kommen die Signale der in Nachbarschaft zum THP-Rest stehenden C-Atome C17, C16, C14,

*) K. Hintzer und U. Leyrer danke ich für die Überlassung des ^{13}C-NMR-Spektrums dieser Substanz.

C13 und C12 doppelt vor. Unerwartet ist das Doppelsignal von C5, da dieses C-Atom räumlich sehr weit von der Schutzgruppe entfernt ist.

Aus der Literatur ist ein ähnlicher Fall bekannt[49]: Fukujusonoron ist ein natürlich vorkommendes 1:1 17α, 17β-Epimerengemisch. Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind außer den Signalen der C-Atome der Seitenkette an C17, die Signale von C17, C16, C15, C14, C13, C12 und ebenfalls von C5 doppelt vorhanden.

Die Zuordnung der Signale der heterocyclischen C-Atome des Tetrahydropyranylringes gelingt nach Literaturangaben[50] von ^{13}C-NMR-Daten von Tetrahydropyran und 1,3-Dioxan (s. Abb. 7). Tab. 5 zeigt die chemischen Verschiebungen von THP-Testosteron 3. Tab. 2 zeigt die Verschiebungsinkremente von C-Atomen in der Umgebung der THP-Schutzgruppe für beide Komponenten von 3.

Tab. 2: ^{13}C-Verschiebungsinkremente für beide Komponenten von THP-Testosteron 3

C-Atom	THP-Testo 3_1	THP-Testo 3_2
12	+ 1.0	+ 0.5
13	+ 0.1	- 0.4
14	+ 0.1	0.0
15	+ 0.1	--
16	- 1.7	- 3.2
17	+ 4.9	+ 2.5
18	+ 0.6	--

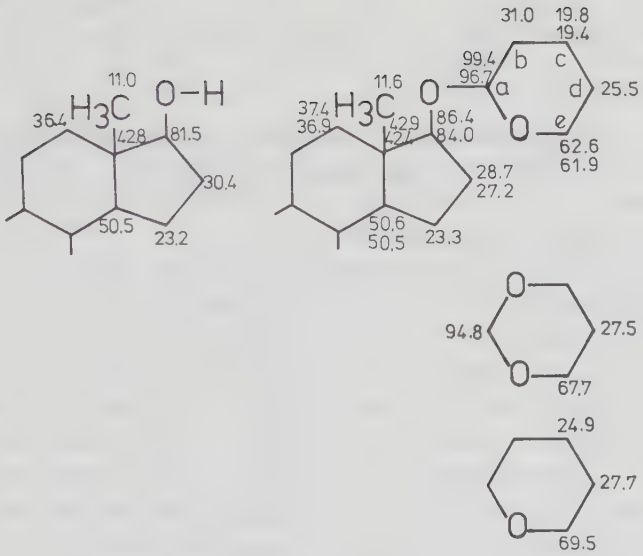


Abb. 7: ^{13}C-Zuordnungen von THP-Testosteron 3 mit Hilfe der Werte von Testosteron, 1,3-Dioxan und Tetrahydropyran

Die Inkremente sind bei den C-Atomen C17, C16 und C12, die in direkter Nachbarschaft zum THP-Rest stehen, am stärksten ausgeprägt. Bei beiden Komponenten erfährt C17 eine Tief-

feld-, C16 jedoch eine Hochfeldverschiebung. Die Signale der restlichen C-Atome des D-Ringes und von C18 sind nicht nennenswert verschoben. In Tab. 3 sind die Differenzen der chemischen Verschiebungen von beiden Diastereomeren angegeben.

Tab. 3: Differenzwerte der ^{13}C-chemischen Verschiebungen der beiden Diastereomeren von THP-Testosteron 3

C-Atom	$3_1 - 3_2$
12	0.5
13	0.5
14	0.1
16	1.5
17	2.4
a	2.7
c	0.4
e	0.7

Sie sind wie erwartet bei C17, der Verknüpfungsstelle mit der Schutzgruppe, und beim acetalischen C-Atom C-a am größten. Letzteres ist das asymmetrische C-Atom des THP-Restes und damit für die Diastereomerenbildung verantwortlich.

2.2.3. Das Produktverhältnis der beiden Diastereomeren bei den Reaktionsstufen der THP-Derivate

Mit den Intensitäten der Signale in einem protonenbreitbandentkoppelten Spektrum lassen sich normalerweise wenig zuverlässige Aussagen machen. Wenn aber, wie bei einem Diastereomerenpaar die Art des C-Atoms dieselbe ist, und die Signale daher eng beieinander liegen, müssen aus den

Intensitäten Schlußfolgerungen über das Produktverhältnis erlaubt sein.

Während bei THP-Testosteron 3 das Signalverhältnis der THP-C-a-Signale und der C17-Signale 1:0.69 bzw. 1:0.68 beträgt, ist das Verhältnis bei den entsprechenden Signalen von 6β-Bromtestosteron 4 1:3.89 bzw. 1:3.68. Das heißt, daß Produktverhältnis hat sich nach der allylischen Bromierung und anschließenden Kristallisation des Hauptprodukts wesentlich zu Gunsten der zweiten Diastereomerenkomponente verschoben. Der 60 %-Anteil der ersten Komponente in THP-Testosteron 3 ist auf 21 % in 6β-Brom-THP-Testosteron 4 zurückgegangen. Bei der 4-Thioenolethercarbonsäure von THP-Testosteron 6 ist bei den genannten beiden C-Atomen jeweils nur noch das Signal der zweiten Komponente vorhanden. Das bedeutet, daß die ursprünglichen 40 % der zweiten Komponente nach zwei weiteren Reaktions- und Kristallisationsschritten auf 100 % angereichert worden sind. Die Anreicherung nur einer Komponente des Diastereomerenpaares durch Kristallisation wird durch die polaren Brom- bzw. Carboxylreste erst ermöglicht (s.u.: Chromatographische Trennung der 17α- und 17β-Epimeren 19/1 und 19/2).

2.2.4. Die Felddesorptionsmassenspektren (FD-MS) der THP-Testosteronderivate 3, 4 und 6

Im FD-Massenspektrum von THP-Testosteron 3 (Abb. 8) sind die Peaks für M^+-85 und M^+-101 entsprechend $M^+-C_5H_9O$ und $M^+-C_5H_9O_2$ vorhanden. D.h. der THP-Rest wird ohne oder mit alkoholischem O-Atom abgespalten. Auch der Peak 85 für den THP-Rest selbst ist im Spektrum vorhanden.

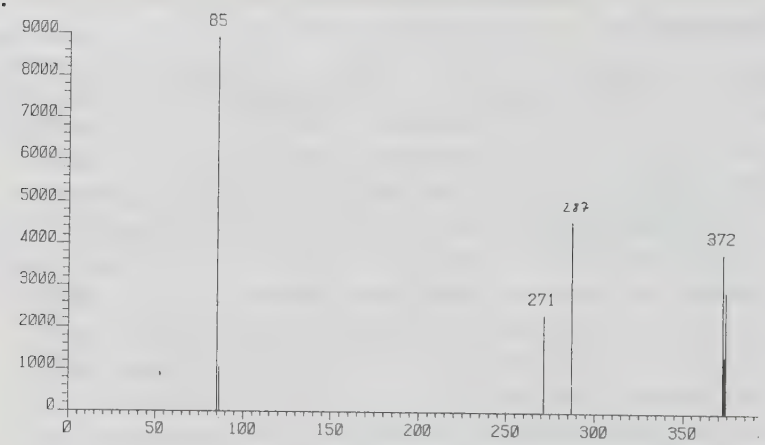


Abb. 8: FD-Massenspektrum von THP-Testosteron 3 (M = 372); Lösungsmittel: $CHCl_3$; Ionenquelle-Temperatur 65°C

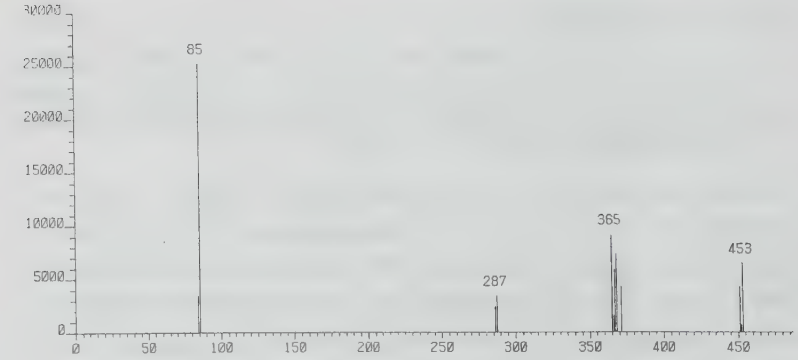


Abb. 9: FD-Massenspektrum von 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4 (M = 451); Lösungsmittel $CHCl_3$; Ionenquelle-Temperatur: 65°C

Bei 6β-Brom-THP-Testosteron 4 (Abb. 9) sind die Peaks für M^+-79 bzw. M^+-81 und M^+-(85+79) bzw. M^+-(85+81) vorhanden: die Bromisotope 79 und 81 werden ohne oder mit dem THP-Rest abgespalten. Bei den FD-Spektren der 4-Thioenolethercarbonsäure von THP-Testosteron 6 wird nur der THP-Rest mit oder ohne O17 abgespalten, nicht aber der neueingeführte Substituent.

3. Synthese der 4-S-Carboxyethylthioenolether-Derivate von Progesteron 2 und von THP-Testosteron 6 und von Testosteron 7

3.1. Die Reaktion der 6β-Brom-4-en-3-ketosteroide mit 3-Mercaptopropionsäure

Schon Lindner und Mitarbeiter[11)] haben versucht, aus 6-Bromprogesteron und Mercaptoessigsäure durch zweistündiges Kochen in Kaliumhydroxid/Methanol den Progesteron-6-carboxymethylenthioether zu erhalten. Wie weiter unten dargelegt wird, ist es zweifelhaft, ob diese Autoren das 6-stustituierte Derivat erhalten haben.

Im Rahmen dieser Dissertation und der vorangegangenen Diplomarbeit wird diese Reaktion mit 3-Mercaptopropionsäure durchgeführt, weil deren Mercaptogruppe eine größere Nukleophilie besitzt als die der Mercaptoessigsäure. Als Base, die die Sulfhydrilgruppe in ihr Anion umwandelt, das das eigentliche nukleophile Agens darstellt, findet vor allem Triethylamin Verwendung; Natriumhydrid hat sich ebenso bewährt. Unter der Annahme, daß es sich um eine S_N2-Reaktion handelt, wird sie nicht in polar protischen Methanol sondern in dipolar aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Hexamethylphosphorsäuretriamid durchgeführt. Bei allen Versuchen, die mit diesen Lösungsmitteln

bei etwa 0°C ablaufen, erhält man etwa 80-90 %igen Reaktionsumsatz. Es entsteht ein Hauptprodukt, das aber immer 10-20 % mit einem etwas polareren Nebenprodukt verunreinigt ist. Es unterscheidet sich dünnschichtchromatographisch im System F nur sehr wenig vom Hauptprodukt und läßt sich auch durch Umkristallisieren nicht entfernen. Es wird zunächst angenommen, daß es sich beim Hauptprodukt um das 6α-Thioethercarbonsäurederivat handelt.

Läßt man die Reaktion bei Raumtemperatur ablaufen, und variiert die genannten Lösungsmittel und Basen, so zeigt sich, daß die Kombination Dimethylsulfoxid/Triethylamin die besten Resultate ergeben. Das Reaktionsgleichgewicht hat sich schon nach spätestens einer Stunde eingestellt; es sind dann noch ca. 10-20 % Ausgangsprodukt vorhanden. Das Nebenprodukt ist nur noch in Spuren auf dem Dünnschichtchromatogramm zu beobachten.

Auch die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wird beim THP-Testosteronderivat 6 verbessert: Das Carbonsäurederivat wird bei pH 3-4 aus wässriger Lösung ausgefällt. Nach Auswaschen mit Wasser und Absaugen wird das restliche Wasser rasch durch azeotrope Destillation erst mit Ethanol, dann mit Ethylacetat entfernt. Schließlich wird das Produkt aus Ethylacetat kristallisiert. Durch Umkristallisieren wird das restliche Bromid aus dem Rohprodukt entfernt.

Insgesamt wird bei dieser und späteren Aufarbeitungen möglichst darauf geachtet, daß das Produkt schon nach kurzer Zeit in kristalliner Form vorliegt. Langwierige Prozeduren, wie Trocknen wässriger Kristallsuspensionen oder langsames Wachsenlassen von Kristallen, führen selbst bei -20°C zur Zersetzung eines Teils der Produkte, die dann oft als gelbe viskose Öle vorliegen, die dünnschichtchromatographisch dieselben Eigenschaften wie das kristalline Produkt haben. Man muß beim sofortigen Kristallisieren allerdings in Kauf nehmen, daß die Schmelzpunkte trotz chromatographischer Reinheit einige Grade tiefer als beim langsam kristallisierten Produkt liegen.

3.2. Die spektroskopische Untersuchung von 7 bzw. 6 und 2 (Beweis für die Umlagerung)

3.2.1. Die ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren

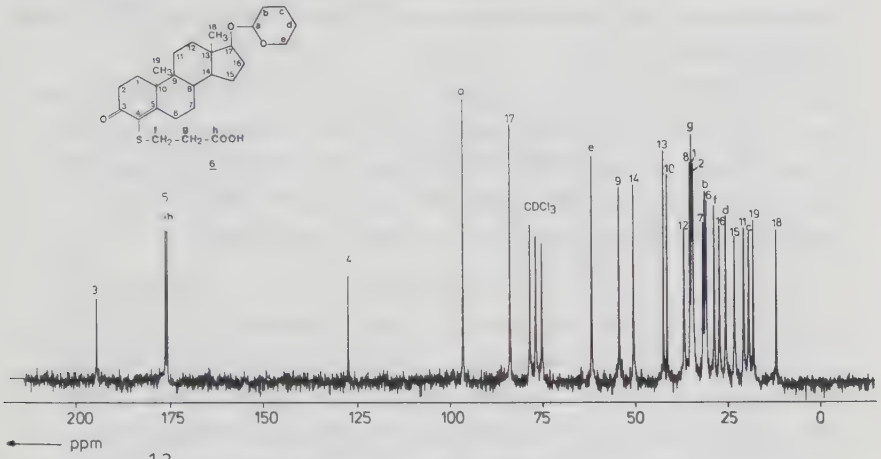


Abb. 10: ^{13}C-NMR-Spektrum von 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)-testosteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolether 6; protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$; 9500 Pulsinterferogramme

Das ^{13}C-NMR-Spektrum nach der Spin-Echo-Methode (Programm J-MOD), bei dem sekundäre und quartäre C-Atome positive, primäre und tertiäre aber negative Signale haben, zeigt bei 7 (Abb. 11) im tiefen Feld vier positive Signale. Auch im Spektrum mit dem Programm GASPE bei dem nur die Signale der quartären C-Atome erscheinen, sind im tiefen Feld diese vier Signale vorhanden. Im entsprechenden Off-resonance-Spektrum erscheinen an derselben Stelle vier Singuletts. Diese Signale sind den vier quartären C-Atomen C3, C4, C5 und C-h, dem C-Atom der Carboxylgruppe, zuzuordnen. D.h. also, daß in 7 beide olefinischen C-Atome quartär, also substituiert sind. Da die UV- und CD-Spektren darauf hinweisen, das im Molekül die α, β-ungesättigte Ketogruppierung noch vorhanden ist (s.u.), muß es sich bei den beiden C-Atomen der Doppelbindung

tatsächlich um C4 und C5 handeln; eine C5-C6-Doppelbindung kommt somit nicht infrage. In Übereinstimmung mit dem FD-MS-Spektrum und der Tatsache, daß kein neues tertiäres C-Atom etwa von C6 im Spektrum auftritt, bedeutet das, daß das vinylische H4 des Testosterons in 7 durch die $S-CH_2-CH_2-COOH$-Gruppe ersetzt ist.

Bei der Reaktion des 6β-Bromderivates 4 mit den Dianion der Mercaptopropionsäure ist also nicht das erwartete 6α-Thioethercarbonsäurederivat sondern durch Allylumlagerung das 4-S-Carboxyethylthioenoletherderivat 6 und daraus nach Schutzgruppenabspaltung das analoge 7 entstanden.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß in den analogen Derivaten von THP-Testosteron 6 und Progesteron 2 die Signale des A- und B-Ringes ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen wie bei 7; die Umlagerung ist daher nicht unter den Bedingungen der Schutzgruppenabspaltung eingetreten.

Schon Lindner und Mitarbeiter[11] war aufgefallen, daß beim analogen Progesteronderivat H4 im vinylischen Bereich des ^{1}H-NMR-Spektrums fehlt. Diese Autoren interpretieren diese Tatsache als intramolekulare Wechselwirkung von H4 mit einem vermeintlichen C6-Substituenten. Eine Umlagerung des Substituenten von C6 nach C4 halten sie für unwahrscheinlich, da sie eine breite Bande zwischen 3.17 und 3.82 ppm dem einen Proton an C6 zuordnen. Auch in den ^{1}H-NMR-Spektren von 6 und 7 ist kein vinylisches Proton vorhanden. H19 ist bei 6 und 7 um +0.06 ppm gegenüber Testosteron tieffeldverschoben (siehe Abb. 12 und Tab. 4).

Die Zuordnung der ^{13}C-Signale des Thioenolethercarbonsäurederivates 7 ist schwierig, da entsprechende Vergleichssubstanzen aus der Literatur nicht bekannt sind.

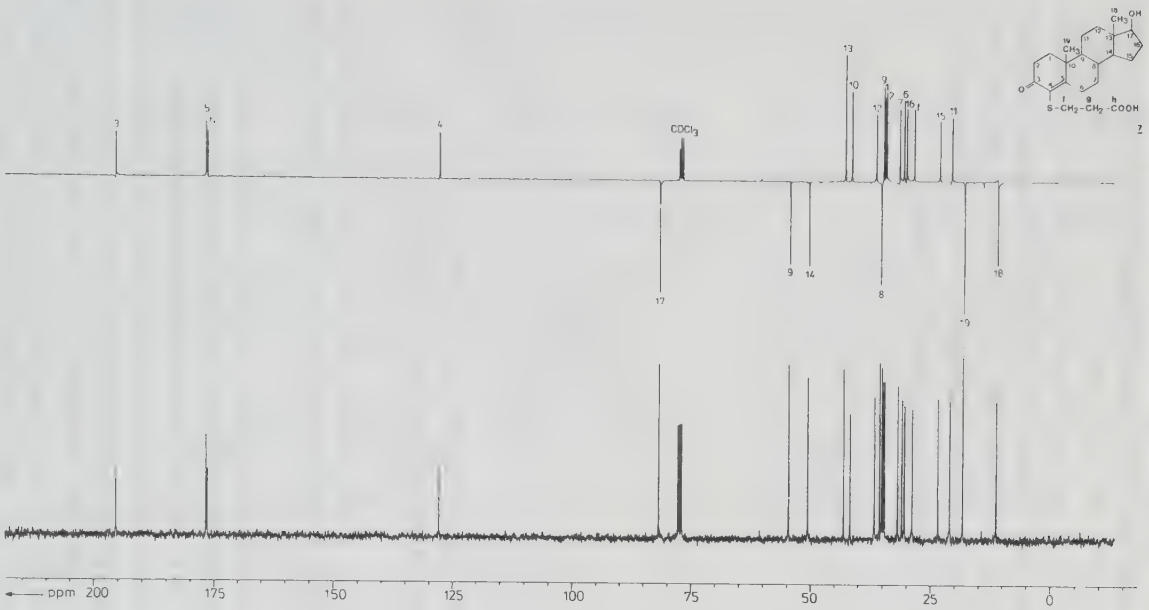


Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Testosteron-4-S-(carboxyethyl)-thioenolether 7 (Spin Echo; 100 MHz; 400 Pulsinterferogramme; 85 mg in 1 ml $CDCl_3$)

Für die beiden olefinischen C-Atome C4 und C5 kommen die Signale 176.6 ppm und 127.7 ppm infrage, da der Wert 176.3 ppm dem Carboxyl-C-Atom C-h zugeordnet wird (s.u.). Trifft man die Zuordnung 127.7 ppm zu C4 und 176.6 ppm zu C5, ergeben sich für die beiden C-Atome Tieffeldverschiebungsinkremente von +3.9 ppm bzw. von +5.5 ppm. Da bei C4 ein Wechsel der Multiplizität vom tertiären zum quartären C-Atom stattfindet, ist das genannte Inkrement unerwartet gering.

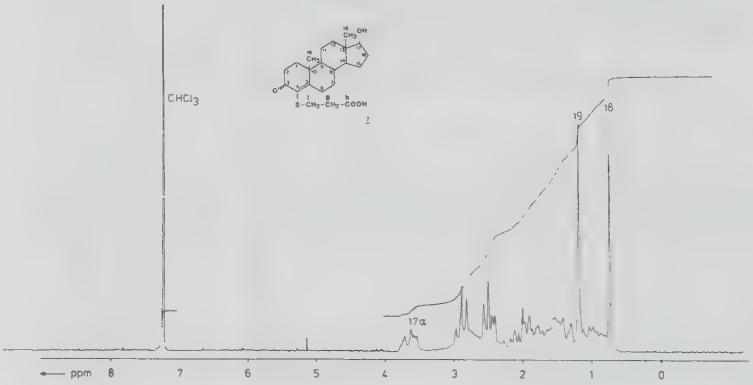


Abb. 12: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von Testosteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolether 7 in $CDCl_3$

Es ist deshalb zu diskutieren, ob nicht die umgekehrte Zuordnung, also 176.6 ppm zu C4 und 127.7 ppm zu C5, infrage kommt.

Bei 4-En-3-ketosteroiden liegt ein vinyloges System vor, d.h. die π-Elektronen sind über das gesamte ungesätttigte System delokalisiert. In der polaren mesomeren Grenzstruktur ist die positive Ladung nicht an Carbonyl-C-Atom, sondern an dem von der Carbonylgruppe am weitesten entfernten Doppelbindungs-C-Atom lokalisiert. Das bedeutet, daß bei Testosteron C5 den verhältnismäßig hohen Wert von 171.1 ppm hat. Damit verbunden ist eine Erhöhung der Elektronendichte am Carbonyl-C-Atom C3 im Vergleich zu einfachen Carbonylen. Aus der Literatur sind aber nur Inkremente von olefinischen C-Atomen bei vinylischer Substitution von einfachen Doppelbindungen, nicht

Tab. 4: Die wichtigsten chemischen Verschiebungen (90 mHz; $CDCl_3$) in den ^{1}H-NMR-Spektren der Testosteronderivate 3, 4, 6 und 7

	Testo	THP-Testo 3	6βBr-THP-Testo 4	4-TEEC-THP-Testo 6	4-TEEC-Testo 7
$H18_2$	0.75(s;3H)	0.79(s;3H)	0.87(s;3H)		0.78(s;3H)
$H18_1$		0.81(s;3H)		0.81(s;3H)	
H19	1.15(s;3H)	1.17(s;3H)	1.53(s;3H)	1.21(s;3H)	1.21(s;3H)
H17α	3.62(t;1H)	3.81(t;1H)	3.74(t;1H)	3.74(t;1H)	3.60(t;1H)
H acetal.		4.59(m;1H)	4.59(m;1H)	4.58(m;1H)	
H6α			4.94(t;1H) J = 2.1 Hz		
H4	5.67(s;1H)	5.70(s;1H)	5.88(s;1H)		

aber von konjugierten Systemen, bekannt. Die Inkremente am β-C-Atom hängen davon ab, ob das α-H-Atom durch einen +M- oder einen -M-Substituenten ersetzt ist. +M-Substituenten erhöhen die Elektronendichte am β-C-Atom und führen somit zu einer Hochfeldverschiebung, während -M-Substituenten infolge ihres Elektronenzugs das β-C-Atom entschirmen; die Folge ist eine Tieffeldverschiebung[176]. So ist von dem Enolether Methylvinylether (Komponente Nr. 1268)[51] bekannt[52,53], daß das tertiäre α-C-Atom den Wert 152.7 ppm und das sekundäre β-C-Atom den Wert 84.4 ppm hat. Im Vergleich dazu haben die beiden C-Atome in Ethern den Wert 123.3 ppm. Die Tieffeldverschiebung am substituierten α-C-Atom beträgt demnach +29.4 ppm, die Hochfeldverschiebung am β-C-Atom -38.9 ppm. Ist das α-C-Atom mit S-CH_2-Phenyl substituiert, betragen die Inkremente +18.5 ppm für das α-C-Atom und -16.4 ppm für das β-C-Atom[177].

Überträgt man diese Befunde auf das Thioenoletherderivat 7, sollte auch C4 eine entsprechend große Tieffeldverschiebung und C5 eine große Hochfeldverschiebung erfahren. Bei der Zuordnungsmöglichkeit 176.6 ppm zu C4 und 127.7 ppm zu C5 betragen die Inkremente +52.8 ppm bzw. -43.4 ppm. Beide Beträge sind unwahrscheinlich hoch, sodaß der zuerst genannten Zuordnung der Vorzug gegeben wird. In diesem Zusammenhang sollte noch erwähnt werden, daß das enolische C-Atom in der Enolform des Acetessigesters den Wert 177.6 ppm hat[54].

Dem Carboxyl-C-Atom C-h wird der Wert 176.3 ppm aufgrund des Vergleichs der ^{13}C-Daten von 2 mit einem zu 2 analogen Derivat, bei dem H4 durch den S-Phenyl-Rest substituiert ist, zugeordnet. Der entsprechende Wert von 3-Mercaptopropionsäure (Komponente Nr. 1358)[51] beträgt 177.9 ppm.

Das der Carboxylgruppe benachbarte α-C-Atom hat bei 3-Mercaptopropionsäure den Wert 38.2 ppm. Weitere entsprechende Werte sind 34.2 ppm (Capronsäure, Komponente Nr. 1360)[51], 36.0 ppm (Buttersäure, Komponente Nr. 327)[51] und 33.8 ppm (Valeriansäure, Komponente Nr. 328)[51]. Da der verläßlichste

Wert von 3-Mercaptopropionsäure sehr hoch liegt, wird C-g der höchste noch nicht zugeordnete Wert von 34.9 ppm zugeordnet.

Als Zuordnungshilfe für das vom Schwefelatom benachbarte C-f werden 3-Mercaptopropionsäure (Komponente Nr. 1358)[51] und Thioessigsäure-n-butylester (Komponente Nr. 1423)[51] herangezogen. Der Wert von 19.3 ppm bei 3-Mercaptopropionsäure liegt weit im hohen Feld. Die Substitution am Schwefel-Atom dürfte eine Tieffeldverschiebung bewirken. So hat im Thioessigsäure-n-butylester, bei dem der Schwefel acetyliert ist, das Nachbar-C-Atom den Wert 28.7 ppm. C-f von 7 wird daher der Wert 28.6 ppm zugeordnet.

Eine exakte Zuordnung der Signale 34.6, 34.3, 31.6 und 30.7 ppm zu den alicyclischen CH_2-Gruppen C1, C2, C6 und C7 ist aus dem Spin-Echo-Spektrum nicht möglich, da alle C-Atome die gleiche Multiplizität haben. Außerdem sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten gering; auch kann nicht genau vorausgesagt werden, ob die Signale dieser C-Atome durch die Substitution eine Hoch- oder eine Tieffeldverschiebung erfahren. Man kann nun von allen denkbaren Zuordnungsmöglichkeiten für diese 4 C-Atome diejenigen auswählen, bei denen C2 und C7 die kleinsten Inkrementbeträge haben, da beide C-Atome weit von C4 entfernt sind. Weiter kann man C2 ein positives Inkrement zuordnen, weil C1 und C3 ein negatives Inkrement haben. Analog kann man dann für C6 ein negatives Inkrement annehmen. Unter diesen Voraussetzungen ist dann folgende Zuordnung möglich: C1 34.6 (-1.0) ppm, C2 34.3 (+0.4) ppm, C 6 30.7 (-2.0) ppm und C7 31.6 (+0.1) ppm.

Die getroffenen Zuordnungen und Inkremente sind aus den Tab. 5, 6 und 7, sowie aus Abb. 13 ersichtlich.

Tab. 5: Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen (ppm; $CDCl_3$) der Testosteronderivate 3, 4, 6 und 7

C-Atom	Testo	THP-Testo 3	6βBr-THP-Testo 4	4-TEEC-THP-Testo 6	4-TEEC-Testo 7
1	35.6	35.7	37.8	34.6	34.6
2	33.9	33.9	34.1	34.3	34.3
3	199.4	199.3	199.3	195.2	195.3
4	123.8	123.8	126.9	127.7	127.7
5_1		171.2			
5_2	171.1	171.1	165.7	176.7	176.6
6	32.7	32.8	52.1	30.7	30.7
7	31.5	31.5	40.5	31.6	31.6
8	35.6	35.5	30.6	35.2	35.4
9	53.9	53.9	53.2	54.5	54.4
10	38.6	38.7	38.4	41.4	41.5
11	20.6	20.6	20.6	20.7	20.8
12_1		37.4	36.7		
12_2	36.4	36.9	36.3	36.8	36.4
13_1		42.9	42.9	42.4	
13_2	42.8	42.4	42.4	42.2	42.7
14_1		50.6			
14_2	50.5	50.5	49.9	50.5	50.4
15	23.2	23.3	23.2	23.3	23.3
16_1		28.7			
16_2	30.4	27.2	27.0	27.2	30.2
17_1		86.4	86.3		
17_2	81.5	84.0	83.9	84.1	81.5
18	11.0	11.6	11.7	11.7	11.1
19	17.3	17.4	22.2	18.1	18.1
a_1		99.4	99.3		
a_2		96.7	96.6	96.7	
b		31.0	31.1	31.1	
c_1		19.8	19.7	19.7	
c_2		19.4	19.4	19.3	

Fortsetzung der Tab. 5

C-Atom	Testo	THP-Testo 3	6βBr-THP-Testo 4	4-TEEC-THP-Testo 6	4-TEEC-Testo 7
d		25.5	25.6	25.5	
e_1		62.6	62.5		
e_2		61.9	61.8	61.9	
f				28.6	28.6
g				34.8	34.9
h				176.3	176.3

Tab. 6: Die ^{13}C-chemischen Verschiebungen (ppm; $CDCl_3$) der Progesteronderivate 1 und 2

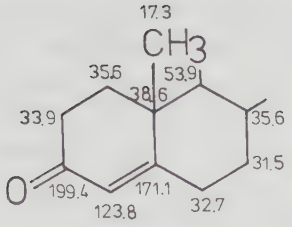
C-Atom	Prog	6βBr-Prog 1	4-TEEC-Prog 2
1	35.6	37.8	34.6
2	33.8	34.1	34.3
3	199.0	199.3	195.1
4	123.8	127.0	127.8
5	170.7	165.2	177.0
6	32.6	51.9	30.6
7	31.8	40.7	31.9
8	35.4	30.6	35.2
9	53.5	52.8	54.1
10	38.4	38.4	41.3
11	20.9	20.9	21.1
12	38.4	38.4	38.6
13	43.7	43.8	43.8
14	55.8	55.3	55.9
15	24.2	24.2	24.2

Fortsetzung der Tab. 6

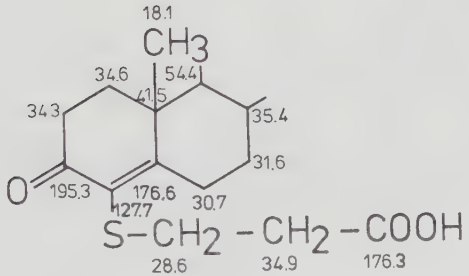
C-Atom	Prog	6βBr-Prog 1	4-TEEC-Prog 2
16	22.7	22.8	22.9
17	63.3	63.4	63.4
18	13.1	13.2	13.3
19	17.2	22.1	18.0
20	208.9	210.6	209.0
21	31.3	31.3	31.3
f			28.5
g			34.8
h			175.8

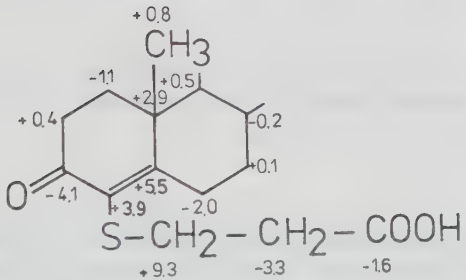
Tab. 7: ^{13}C-Verschiebungsinkremente von 7 bezogen auf Testosteron

C-Atom	4-TEEC-Testo 7
1	-1.0
2	+0.4
3	-4.1
4	+3.9
5	+5.5
6	-2.0
7	+0.1
8	-0.2
9	+0.5
10	+2.9
19	+0.8



Testo.





7

Abb. 13: ^{13}C-Zuordnungen und Verschiebungsinkremente von Testosteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolether 7; Inkremente gebildet durch Vergleich mit Testosteron und 3-Mercaptopropionsäure

3.2.2. Das UV-Spektrum von 7

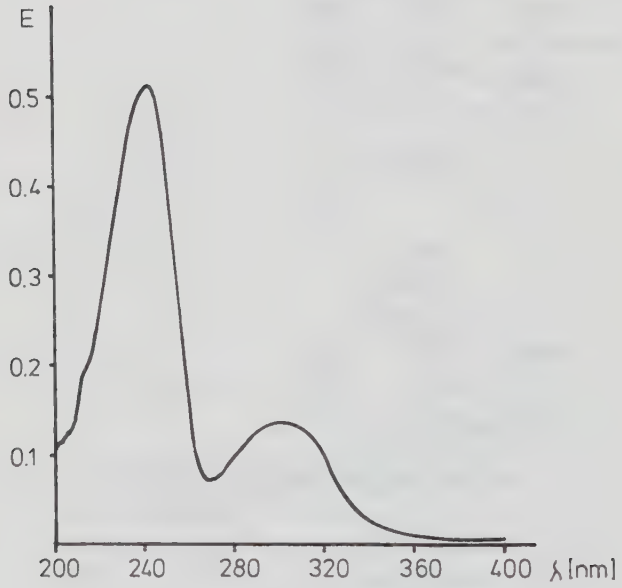


Abb. 14: UV-Spektrum von Testosteron-4-S-(carboxyethyl)-thioenolether 7 in Dioxan; Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

Das in Dioxan gemessene UV-Spektrum von 7 (siehe Abb. 14 und Tab. 8) zeigt zwei Maxima bei 242 nm (Molextinktion 10 200) und bei 303 nm (Molextinktion 2700). Ersteres ist das Absorptionsmaximum des $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergangs des 4-En-3-on-Chromophors und ist gegenüber Testosteron um 7 nm bathochrom verschoben, letzteres stellt den $n \rightarrow \pi^*$-Übergang des Thioenoletherchromophors dar. Im UV-Spektrum der wässrigen Lösung von 7 ist das Maximum des $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergangs bei 252 nm (Molextinktion 11 700); es ist also gegenüber der Messung in Dioxan um 10 nm bathochrom verschoben.

Das UV-Spektrum bestätigt ein α, β-ungesättigtes Ketosystem und weist auf die 4-Substitution hin.

3.2.3. Das CD-Spektrum von 7

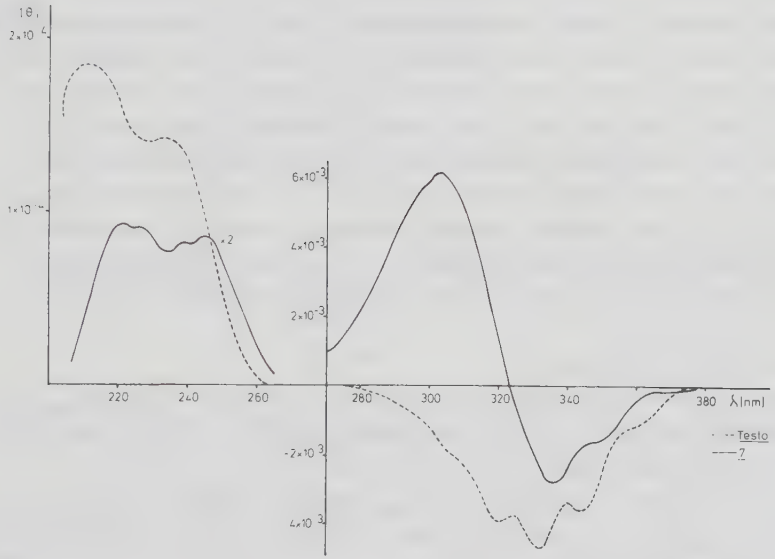


Abb. 15: CD-Spektren von Testosteron und Testosteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolether 7 in Dioxan; Konzentration $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

Der n → π*-Übergang

Das CD-Spektrum von 7 (siehe Abb. 15 und Tab. 8) hat im n → π*-Bereich zwei Cottoneffekte mit unterschiedlichem Vorzeichen. Der langwelligere negative Cottoneffekt hat drei Minima. Das intensivste Minimum liegt bei 336 nm.

Dieser negative Teil des n → π^*-Übergangs behält also sein Vorzeichen bei und zeigt damit, daß keine 6β-Substitution vorliegt; bei 6α-Substitution wäre er allerdings ebenfalls negativ. Gegenüber Testosteron ist dieser Cottoneffekt nur um 3.5 nm bathochrom verschoben.

Der zum UV-Maximum bei 300 nm gehörende Cottoneffekt bei 302.5 nm ist dagegen positiv und hat eine hohe molare Elliptizität. Bei 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden ist an dieser Stelle kein Maximum oder Minimum vorhanden. Wenn man die anderen Daten nicht in Betracht zieht, könnte man aus dem Cottoneffekt auf eine gesättigte Ketogruppe im Molekül schließen; allerdings wäre der Cottoneffekt dann um ca. 10 nm bathochrom verschoben. Offensichtlich tritt durch die Bildung des substituierten Thioenols eine gewisse Isolierung der 3-Ketogruppe im Sinne einer Unterbrechung der Kopplung mit dem Doppelbindungssystem ein.

Der π → π^*-Übergang

Der zum UV-Maximum bei 242 nm gehörige π → π^*-Übergang im CD bei 245 nm hat positives Vorzeichen; das wäre auch bei einem 6α-substituierten Derivat der Fall. Die molare Elliptizität liegt etwa in der Größenordnung von der von 17A bzw. 17B, die 6β-substituiert sind und einen negativen Cottoneffekt haben (s.u.).

Der noch energiereichere Übergang bei 222 nm, der beim 4-En-3-on-chromophor immer positiv ist[41] (s.u.), hat auch hier einen positiven Cottoneffekt. Das ist eine starke Stütze für die 3-On-4-en-Gruppierung auch in 7. Die molare Elliptizität dieses Übergangs ist etwa nur halb so groß wie bei Testosteron und etwa fünffach größer als bei 17A oder 17B.

Tab. 8: Maxima und Molextinktion aus den UV-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren von Testosteron und den Testosteronderivaten 3, 4 und 7

THP-Testo 3				6βBr-THP-Testo 4			
	UV	CD			UV	CD	
λ (nm)	ε	λ (nm)	[θ]	λ (nm)	ε	λ (nm)	[θ]
		362.5	-1060				
		345	-3430				
		332.5	-4620			352.5	+7590
		319	-3700				
		305	-1780			300	± 0
				249	18000	254	-73260
236	18800	235	+26400			235	± 0
						222	+40920
		210	+34320			208	± 0
						205	-17160

Testo				4-TEEC-Testo 7			
	UV	CD			UV	CD	
λ (nm)	ε	λ (nm)	[θ]	λ (nm)	ε	λ (nm)	[θ]
		360	-1100			371	- 130
		346	-3560			350	-1560
		332.5	-4690			336	-2730
		319	-3960			323	± 0
		307.5	-2310	303	2700	302.5	+6200
235	16800						
236	18800	235	+28380	242	10200	245	+17150
		211	+37000			222	+18470

3.2.4. Die IR-Spektren von 6 und 7

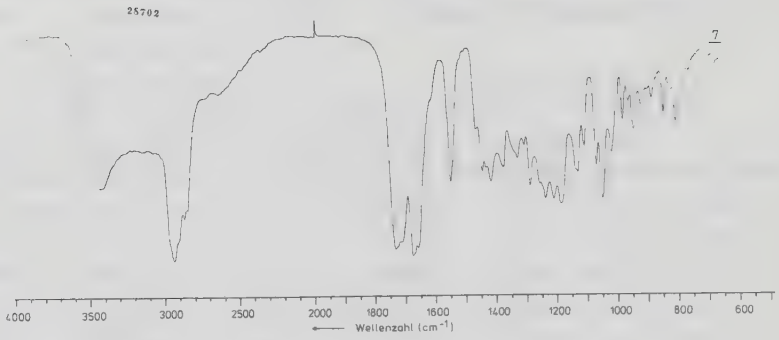


Abb. 16: IR-Spektrum von Testosteron-4-S(carboxyethyl)-thioenolether 7, aufgenommen in KBr

In den IR-Spektren dieser Verbindungen fällt eine verhältnismäßig symmetrische, isoliert stehende Bande bei 1552 bzw. 1548 cm^{-1} auf, statt dessen fehlt die erwartete Bande der C4-C5-Doppelbindung des α, β-ungesättigten Carbonylsystems bei 1615 bzw. 1610 cm^{-1}. Möglicherweise ist diese Bande um 63 bzw. 78 cm^{-1} in den energieärmeren Teil verschoben worden. Für Thioenolether müßte man eigentlich erwarten, daß die Doppelbindungsbande am höheren Ende des Frequenzbereiches absorbiert. In der Literatur[55)] wird für die Doppelbindung in α, β-ungesättigten Ketonen ein Frequenzbereich von 1640 bis 1590 cm^{-1}, für Enolether ein Bereich von 1690 bis 1650 cm^{-1} angegeben.

Die Bande bei 1720 cm^{-1}, die auch zu einem gesättigten Keton passen würde, muß der Carbonylgruppe der Carboxylgruppe zugeordnet werden.

3.2.5. Die Felddesorptionsmassenspektren der Thioenolethercarbonsäurederivate von THP-Testosteron 6 und Testosteron 7

Abb. 17: FD-Massenspektrum von 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)-testosteron-S-(carboxyethyl)thioenolether 6 (M = 476); Lösungsmittel: $CHCl_3$; Ionenquelle-Temperatur 65°C

Die FD-MS-Spektren von 6 und 7 (siehe Abb. 17 und 18) zeigen die erwarteten Molekülpeaks. Der neu eingeführte Substituent an C4 ist relativ stabil unter den Bedingungen der Felddesorptionsmassenspektroskopie. Nur beim 4-Thioenolethercarbonsäurederivat von Testosteron 7 ist im Spektrum ein Peak M^+-106, entsprechend M^+-$S(CH_2)_2COOH$ mit geringer Intensität vorhanden. Offensichtlich wird bei einem Teil der Moleküle zusätzlich noch die 17β-OH-Gruppe abgespalten, wie der Peak mit m/e 269 zeigt.

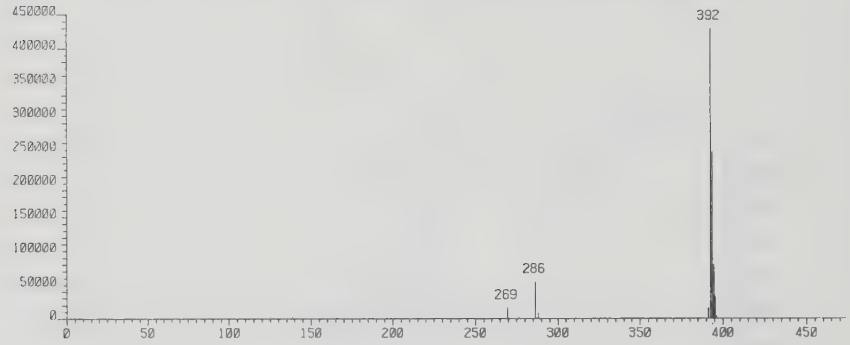


Abb. 18: FD-Massenspektrum von Testosteron-4-S-(carboxyethyl)thioenolether 7 (M = 392.6); Lösungsmittel: $CHCl_3$; Ionenquelle-Temperatur 65°C

3.3. Reaktionsmechanismus der Allylumlagerung

Der Reaktionsmechanismus muß erklären, warum aus dem 6β-Allylbromid ein an C4 vinylisch substituiertes Derivat entstanden ist.

In erster Stufe ist eine Allylumlagerung eingetreten. Sie kann prinzipiell nach zwei verschiedenen Mechanismen ablaufen.

Der S_N1-Mechanismus[56,57].

Aus der in Allylstellung halogenierten Verbindung bildet sich nach Abspaltung des Halogenrestes zunächst ein mesomeriestabilisertes Carbeniumion. Je nach dem an welchem C-Atom das Nukleophil angreift, entsteht das "normale" oder das umgelagerte Substitutionsprodukt. Bei gleicher Wahrscheinlichkeit für beide Produkte wird sich ein Gemisch im Verhältnis 1:1 bilden. Da im vorliegenden Fall nur das umgelagerte Produkt entsteht, dürfte dieser Mechanismus nicht in Betracht kommen.

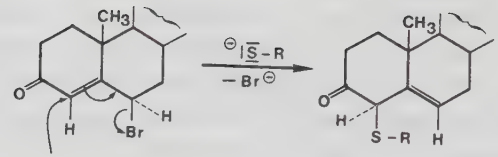
Der S_N2'-Mechanismus[58-62]

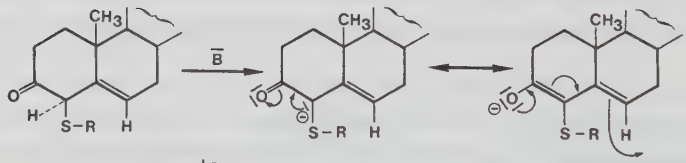
Die Reaktion läuft nach dem Gesetz der zweiten Ordnung ab. Das Nukleophil greift aus sterischen Gründen statt an Cα das γ-Kohlenstoffatom des Allylsystems an, wobei eine synchrone Bildung und Auflösung der σ-Bindungen und Verschiebung der Doppelbindung stattfindet. Der Unterschied zur S_N2-Reaktion besteht darin, daß der Angriff des Nukleophils in syn-Stellung in bezug zur Abgangsgruppe erfolgt. Es handelt sich also um eine synfaciale (= suprafaciale) Reaktion.

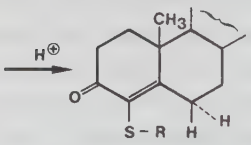
In diesem speziellen Fall würde das bedeuten, daß das Thiolanion von der β-Seite her angreift und zunächst das axiale 4β-Substitutionsprodukt mit der C5-C6-Doppelbindung bildet.

In zweiter Stufe wandert die Doppelbindung wieder an ihre ursprüngliche Stelle. Die Rückbildung des konjugierten Systems dürfte die treibende Kraft für diesen Schritt sein. Sie ist mit einer zumindest formalen Wanderung des Protons (Prototropie) von C4 nach C6 verbunden. Dabei kommt es zu einer basenkatalysierten Enolisierung der Carbonylgruppe: Die Katalysatorbase löst das Wasserstoffatom an C4 als Proton ab, es bildet sich die C4-C5-Doppelbindung. An die C5-C6-Doppelbindung wird ein Proton aus der Lösung addiert, sodaß es letztlich zur Bildung des vinylisch substituierten Produkts kommt.

Die Tatsache, daß ausschließlich das 4-substituierte Produkt gebildet wird und die Leichtigkeit mit der die Reaktion unter S_N2-Bedingungen abläuft, sprechen für den S_N2'-Mechanismus. Es ist allerdings nicht einzusehen, warum der Angriff des Nukleophils von der α-Seite her sterisch gehindert sein soll.


CH3
O
H
Br
H
⊖ |S̄-R
− Br⊖
CH3
O
H
S-R
H


CH3
O
H
S-R
H
B̄
CH3
O
⊖
S-R
H
CH3
⊖ O
S-R
H


H⊕
CH3
O
S-R
H
H

III. DIE SYNTHESE DER 6-METHYLIDENCARBONSÄUREDERIVATE VON TESTOSTERON UND PROGESTERON

1. Die Synthese der π-Allylpalladiumhalogenidkomplexe von Testosteron und Progesteron

1.1. Allgemeine Darstellungsmethoden für π-Allylpalladiumchloridkomplexe

Verschiedene Autoren beschreiben eine allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexen von einfachen Olefinen[63-65]. Sie läuft im wasserfreien stark sauren Milieu ab. Das Olefin wird in Eisessig mehrere Stunden mit Palladiumchlorid und Natriumchlorid unter Zusatz von Natriumacetat und Kupfer-(II)-chlorid erhitzt. Hierbei bildet sich zunächst Natriumtetrachlorpalladat im Reaktionsansatz. Bei empfindlichen Naturstoffen versagt diese Methode. So werden Terpene mit Natriumtetrachlorpalladat in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Aceton, oft unter Zusatz von Calciumcarbonat, bei Raumtemperatur behandelt[66]. Diese Methode eignet sich auch für einfache Olefine[67,68]. Bei einer ähnlichen Methode wird das Olefin mit Palladiumchlorid und Natriumcarbonat bei Raumtemperatur in Chloroform gerührt[69]. Bei einer häufig angewandten Methode wird das Olefin mit Bisbenzonitrilpalladiumdichlorid, einem Olefinkomplex, in benzolischer Lösung erhitzt[70]. Der Olefinkomplex kann leicht aus Benzonitril und Palladiumchlorid dargestellt werden[71]. Die Methode eignet sich auch für Steroidolefine[22,72].

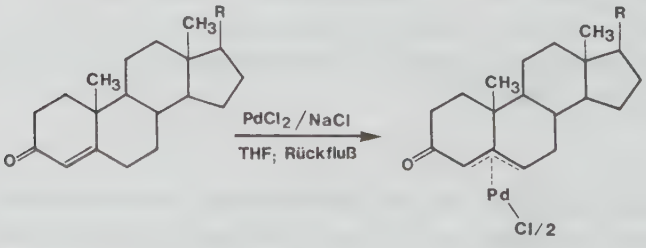
1.2. Die Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8 und von Bis(3,20-Dioxopregnen-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 9

Auch im Rahmen dieser Arbeit ist der Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex mit Bisbenzonitrilpalladiumdichlorid

in Benzol versuchsweise dargestellt worden. Die Bedingungen sind aber für größere Ansätze ungeeignet, da die Synthese zweistufig ist und das Produkt so verunreinigt ist, daß es chromatographiert werden muß.

Wenn man Testosteron mit Palladiumchlorid in Anwesenheit von Natriumcarbonat in Chloroform bei Raumtemperatur umsetzt, entsteht ebensowenig das gewünschte Produkt wie bei der Reaktion von Testosteron mit Natriumtetrachlorpalladat in Ethanol oder Aceton. Es entstehen braungefärbte, polare Produkte, die in organischen Lösungsmitteln schwer löslich sind. Wahrscheinlich handelt es sich um Olefinkomplexe. Eine Umwandlung in den π-Allylkomplex wäre wahrscheinlich bei längerem Rückflußkochen möglich. Vermutlich sind diese Komplexe von Howsam und McQuillin auf diese Weise dargestellt worden[73]. Genaue Angaben sind aus dieser Arbeit nicht zu entnehmen.

Zur Synthese von π-Allylpalladiumchloridkomplexen von 4-En-3-ketosteroiden hat sich die Methode von Collins, Jackson und Timms[14,15] am besten bewährt. Hierbei wird das Steroid mit Palladiumchlorid und überschüssigem Natriumchlorid in Tetrahydrofuran mehrere Tage unter Rückfluß gekocht. Nach dieser Methode werden auch in dieser Arbeit die Testosteron- und Progesteronkomplexe 8 und 9 dargestellt.



R = OH

R = $COCH_3$

8 R = OH

9 R = $COCH_3$

Wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Reaktionsverlaufes zeigt, wird zunächst in rascher Reaktion ein braun gefärbter, stark UV-absorbierender polarer Olefinkomplex gebildet, der dann in langsamer Reaktion in den gelben, schwach UV-absorbierenden, weniger polaren π-Allylkomplex übergeht. Die Aufarbeitung wird dabei so optimiert, daß sich auch größere Mengen in hoher Ausbeute und reiner Form ohne Chromatographie darstellen lassen. Hierbei wird das Produkt aus der Ethylacetatlösung mit n-Hexan gefällt.

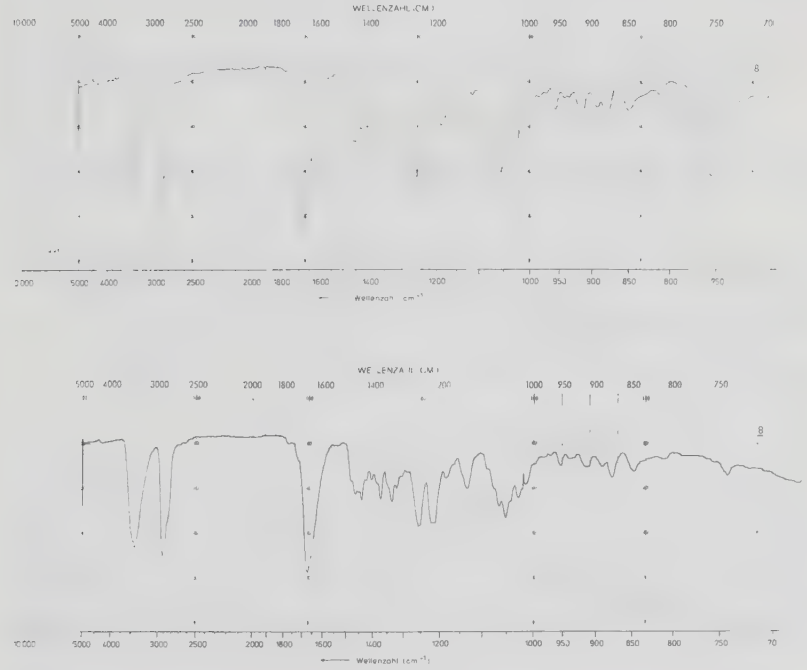


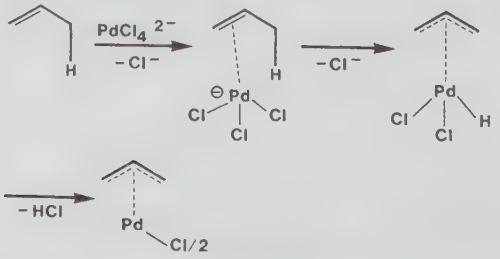
Abb. 19: IR-Spektren von Testosteron-π-allylpalladiumchlorid 8 aufgenommen in KBr;
oben: 8 aus $CHCl_3$ kristallisiert;
unten: 8 aus Ethylacetat kristallisiert

Das im Überschuß vorhandende Ausgangssteroid wird mit n-Hexan ausgewaschen. Zur weiteren Reinigung wird der π-Allylkomplex dann aus Ethylacetat umkristallisiert. Testosteron-π-allylpalladiumchlorid bildet in Ethylacetat große lösungsmittelhaltige Kristalle, die beim Absaugen des Lösungsmittels zum mikrokristallinen analysenreinen Komplex zerfallen. In Chloroform bildet der Testosteronkomplex kleine Nadeln, die Lösungsmittel enthalten, aber beständig sind. Die Elementaranalyse zeigt hohe Chloridwerte und das IR-Spektrum, in KBr gemessen, eine sehr intensive CCl_3-Bande bei 752 cm^{-1} (s.Abb. 19).

1.3. Der Reaktionsmechanismus der π-Allylpalladiumchloridkomplexbildung

1.3.1. Der Mechanismus der Komplexbildung bei der Reaktion im sauren Milieu

Von Trost und Mitarb.[74] wird folgender Mechanismus für die Reaktion unter den oben genannten Bedingungen im sauren Milieu vorgeschlagen:



Ein zunächst gebildeter ionischer Olefinkomplex geht dann in einen hypothetischen Hydridkomplex über. Dabei wird ein Wasserstoff vom allylischen Kohlenstoffatom als Hydridion zum Palladium umgelagert. Das allylische C-Atom wird dadurch positiviert. Der monomere Hydridkomplex geht dann

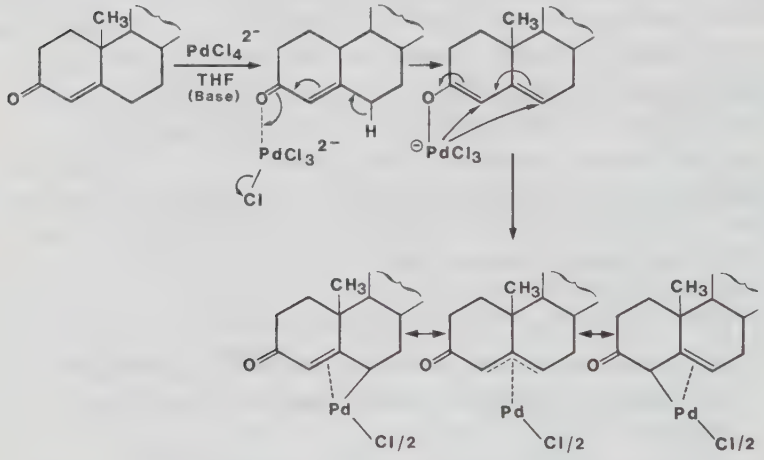
unter Einwirkung einer Base oder eines Oxydationsmittels wie z.B. $CuCl_2$ in den dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplex über. Der Zusatz von Cu(II)-Salzen zum Reaktionsansatz bewirkt sicher auch eine Reoxydation von Palladiummetall, das bei der Oxydation des Olefins durch Palladiumchlorid entsteht.
$2\ Cu^{2+} + Pd \longrightarrow Pd^{2+} + 2Cu^{+}$. Die Ausbeute an Komplex soll somit erhöht werden[75].

Der entscheidende Vorgang bei der Komplexbildung ist die Abstraktion des Hydridions, denn sie führt zu einer Aktivierung des allylischen C-Atoms. Dieses ist im Komplex jetzt gleichberechtigt mit dem ursprünglich vinylischen C-Atom. Beide sind prinzipiell einem nukleophilen Angriff zugänglich. Welches der beiden alkyliert wird, hängt von den Reaktionsbedingungen ab. Wird das ursprünglich vinylische C-Atom angegriffen, tritt eine Allylumlagerung ein, die zu einer Verschiebung der Doppelbindung führt[76].

1.3.2. Der Mechanismus und die Stereochemie der Komplexbildung bei 4-En-3-ketosteroiden im schwach basischen Milieu

Der Palladiumchloridrest bei den π-Allylkomplexen von 4-En-3-ketosteroiden ist α-ständig, daher ist die Stereochemie der Wasserstoffabstraktion an C6 während der Komplexbildung von Interesse. Sie wurde von zwei Arbeitsgruppen an 6β- bzw. 6α-deuteriertem Cholest-4-en-3-on untersucht[77-80]. Es zeigt sich, daß bei der Komplexbildung bevorzugt das 6β-Deuterium- bzw. Wasserstoffatom entfernt wird, das in diesem Fall trans zum eintretenden Metall steht. Beide Arbeitskreise bevorzugen einen Mechanismus, der eine Enolisierung zu einem 3,5-Dienol als Zwischenstufe annimmt. Im einzelnen läuft danach der Reaktionsmechanismus über folgende Schritte ab: Das im Reaktionsansatz gebildete Tetrachlorpalladat-(II)-ion wirkt als elektrophiles Agens und polarisiert die Carbonyl-

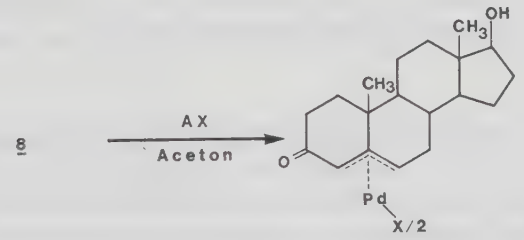
gruppe an C3. Eine schwache Base z.B. Tetrahydrofuran (PK_B 16) entfernt H6β als Proton und führt somit zur Bildung der thermodynamisch stabilen Cholest-3,5-dien-3-ol-Zwischenstufe. Der nächste Schritt, der schließlich zur Bildung des π-Allylpalladiumkomplexes führt, erfordert eine 1,3- bzw. 1,5-Verschiebung des Palladiumrestes vom Sauerstoff an C3 zu C4 bzw. C6 auf der α-Seite des Steroids.



Nach Oberhansli und Dahl[81] handelt es sich bei der Bindung des Palladiums im Trihaptokomplex um die Überlappung von dsp^2-σ-Hybridorbitalen des Palladiums mit den delokalisierten π-Orbitalen der allylischen Gruppe.

1.4. Die Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumbromid) 10, -jodid 11, -thiocyanat 12, -chlorid-pyridin 13 und -chlorid-triphenylphosphin 14

Beim dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplex kann das Chlorid leicht durch Bromid, Jodid oder Thiocyanat ausgetauscht werden. Dazu muß der Chloridkomplex mit der entsprechenden acetonischen Alkalimetallsalzlösung (Lithiumbromid, Natriumjodid, Kaliumthiocyanat) kurze Zeit bei Raumtemperatur behandelt werden[67,75]. In der vorliegenden Arbeit werden auf diese Weise aus dem dimeren Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex 8 die dimeren Bromid(10)-, Jodid(11)- und Thiocyanat(12)-Komplexe dargestellt.



AX = LiBr — 10 X = Br

AX = KJ — 11 X = J

AX = NaSCN — 12 X = SCN

Das IR-Spektrum des Thiocyanatkomplexes 12 zeigt die SCN-Bande bei 2135 cm^{-1} (Abb. 20).

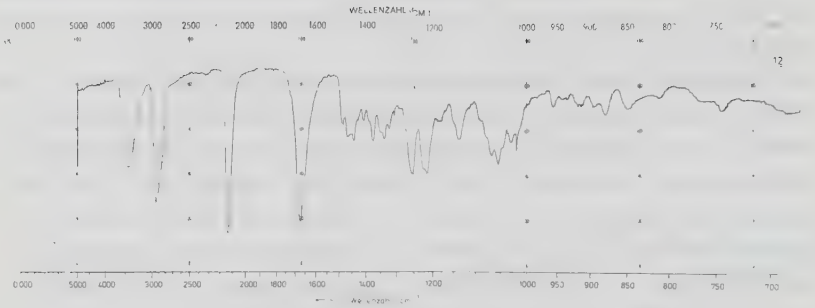
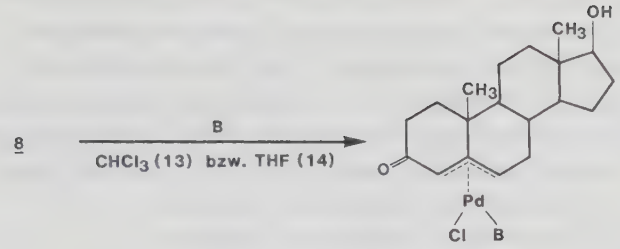


Abb. 20: IR-Spektrum von Testosteron-π-allylpalladium-thiocyanat 12 aufgenommen in KBr

Wird der dimere Chloridkomplex mit Pyridin in Dichlormethan behandelt, werden zwei der vier Chloratome gegen Pyridin ausgetauscht. Es entstehen zwei monomere Moleküle des π-Allylpalladiumkomplexes, bei denen das Palladium jeweils mit einem Chlorid- und einem Pyridinrest koordiniert ist[82]. Auf analoge Weise entsteht der monomere Chlorid-Triphenylphosphinkomplex, wenn man den dimeren Chloridkomplex mit Triphenylphosphin in Tetrahydrofuran behandelt. Auf ähnliche Weise können auch die Chinolin- und Acetylacetonatkomplexe dargestellt werden. Hier werden so aus dem Testosteronkomplex 8 die Chlorid-Pyridin(13)- und Chlorid-Triphenylphosphin(14)-Komplexe dargestellt.



13 B = C_5H_5N

14 B = $(C_6H_5)_3P$

1.5. Die spektroskopische Untersuchung der π-Allylpalladiumkomplexe von Testosteron und Progesteron 8, 9, 10, 11, 12 und 13

1.5.1. Die FD-Massenspektren der π-Allylpalladiumhalogenidkomplexe 8, 9, 10 und 11

Die Elektronenstoßmassenspektroskopie versagt bei der Bestimmung der Molmasse der Steroid-π-allylpalladiumkomplexe, weil die Komplexe unter dem dort angewandten drastischen Bedingungen sich thermisch zersetzen. Der Peak mit der höchsten Masse und oft gleichzeitig der Basispeak ist daher oft der Molekülpeak des entsprechenden Ausgangssteroids.

Bei der Felddesorptions-Massenspektroskopie[83] werden die Ionen durch den Einfluß eines hohen elektrostatischen Feldes in der Größenordnung von 10^7 bis 10^8 Volt/cm erzeugt. Dabei wird das Potential der äußeren Elektronenhülle eines Atoms oder Moleküls so verändert, daß ein Elektron durch den sogenannten Tunneleffekt entfernt wird. Das führt zur Bildung eines positiven Ions. Die Desorption des Molekülions von der Emitteroberfläche erfordert eine relativ ge-

ringere Energie als die Desorption eines neutralen Moleküls. Bei der konventionellen Ionierung einer festen Probe muß die vollständige Sublimationsenergie für die Verdampfung angewandt werden; die Felddesorption erfordert aber nur die relativ geringe Ionendesorptionsenergie. Unter FD-Bedingungen werden nicht nur Radikalkationen des Moleküls $[M]^+$ beobachtet, sondern es werden auch protonierte Moleküle $[M+H]^+$ durch induzierte Oberflächenreaktionen gebildet.

Ein kritischer Punkt bei der praktischen Durchführung der Felddesorption ist die Herstellung eines Emitters von einheitlicher Qualität. Dabei werden Wolframdrähte mit partiell orientiertem Pyrokohlenstoffwhiskers überzogen, die durch Pyrolyse von Benzonitril in einem hohen elektrischen Feld erzeugt werden. Die Probe wird durch Eintauchen dieser aktivierten Emitter in eine Substanzlösung aufgebracht. Für die Desorption, vor allem für polare Substanzen, muß thermische Energie zugeführt werden. Bei der optimalen Anodentemperatur wird ein Intensitätsmaximum des Molekülions bei minimaler Fragmentierung erreicht. Wird die Arbeitstemperatur leicht über diese Temperatur erhöht, entstehen Fragmente durch einfache Bindungsspaltung, die dann entsprechend leicht interpretiert werden können. Die FD-Massenspektroskopie eignet sich also gut für thermisch leicht zersetzliche oder schwer flüchtige Substanzen. Diese Eigenschaften treffen auf viele Naturstoffe zu.

In der vorliegenden Arbeit werden die dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexe von Testosteron 8 und Progesteron 9 und die durch Halogenaustausch dargestellten dimeren Bromid(10)- und Jodid(11)-Komplexe von Testosteron in der FD-Massenspektroskopie untersucht. In Tab. 9 werden die auf Grund der verschiedenen Isotopenzusammensetzung der Halogen- und Palladiumisotope erwarteten Peaks, den gefundenen gegenüber gestellt. Bei den erwarteten Isotopen sind beim Palladium nur die häufigsten berücksichtigt. Die

Peaks treten im Spektrum nur mit geringer Intensität auf, da sich die Komplexe auch unter den Bedingungen der FD-Massenspektroskopie rasch zersetzen. Es ist ferner zu beobachten, daß sich nicht nur ein sondern mehrere Protonen an das Molekülradikalion anlagern können, d.h. man kann oft nicht zwischen $[M]^+$ und $[M+1]^+$ unterscheiden.

Tab. 9: Interpretation der Molekülionenpeaks aus den FD-Massenspektren der Testosteron- und Progesteron-π-allylpalladiumhalogenidkomplexe 8, 9, 10 und 11

Testo PdCl 8	erwartet für $[M]^+$	erwartet für $[M+H]^+$	gefunden
$^{35}Cl+^{104}Pd$	852	853	
$^{35}Cl+^{105}Pd$	854	855	
$^{35}Cl+^{106}Pd$	856	857	857
$^{35}Cl+^{108}Pd$	860	861	859 861 863
$^{37}Cl+^{104}Pd$	856	857	857
$^{37}Cl+^{105}Pd$	858	859	859
$^{37}Cl+^{106}Pd$	860	861	861
$^{37}Cl+^{108}Pd$	864	865	863
Testo PdBr 10			
$^{79}Br+^{104}Pd$	940	941	
$^{79}Br+^{105}Pd$	942	943	943
$^{79}Br+^{106}Pd$	944	945	945
$^{79}Br+^{108}Pd$	948	949	946
$^{81}Br+^{104}Pd$	944	945	944 945

Fortsetzung der Tab. 9

Testo PdBr 10	erwartet für $[M]^+$	erwartet für $[M+H]^+$	gefunden
$^{81}Br^{+105}Pd$	946		946
		947	947
$^{81}Br^{+106}Pd$	948		
		949	949
Testo PdJ 11			
$^{127}J^{+104}Pd$	1036		
		1037	1037
$^{127}J^{+105}Pd$	1038		
		1039	1038
$^{127}J^{+106}Pd$	1040		
		1041	1041
			1042
			1043
$^{127}J^{+108}Pd$	1044		
		1045	1045
			1047
Prog PdCl 9			
$^{35}Cl^{+104}Pd$	904	905	
$^{35}Cl^{+105}Pd$	906		
		907	
$^{35}Cl^{+106}Pd$	908		908
		909	909
			911
$^{35}Cl^{+108}Pd$	912		912
		913	913
$^{37}Cl^{+104}Pd$	908		908
		909	909
$^{37}Cl^{+105}Pd$	910		
		911	911
$^{37}Cl^{+106}Pd$	912		912
		913	913
$^{37}Cl^{+108}Pd$	916		916
		917	917
			918

1.5.2. Die CD- und UV/VIS-Spektren der Testosteron-π-allyl-palladiumkomplexe 8, 10, 11, 12 und 13

Die CD-Spektren der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 12, 13 und 8, 10, 11 werden in den Abb. 21 und 22, die UV/VIS-Spektren in den Abb. 23 und 24, die zugehörige Daten in den Tab. 10 und 11 dargestellt.

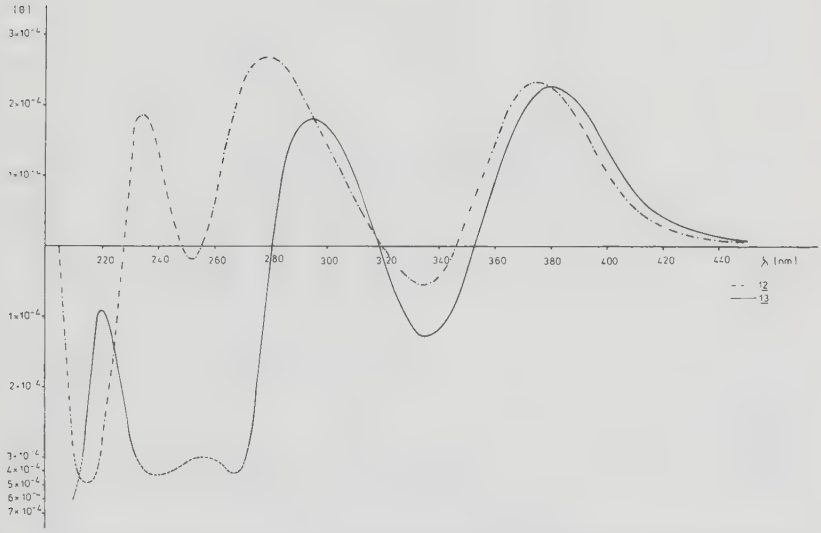


Abb. 21: CD-Spektren der Testosteron-π-allylpalladium-komplexe: Thiocyanat 12 und Chlorid-Pyridin 13 in Dioxan

Ordnet man die untersuchten π-Allylpalladiumkomplexe nach steigender Wellenlänge ihrer langwelligsten Maxima, so ergibt sich die Reihenfolge: Thiocyanat 12, Chlorid-Pyridin 13, Chlorid 8, Bromid 10, Jodid 11. Die Wellenlängen der Maxima steigen dabei von 375 nm beim Thiocyanatkomplex 12 bis 422 nm beim Jodidkomplex 11, also um 47 nm.

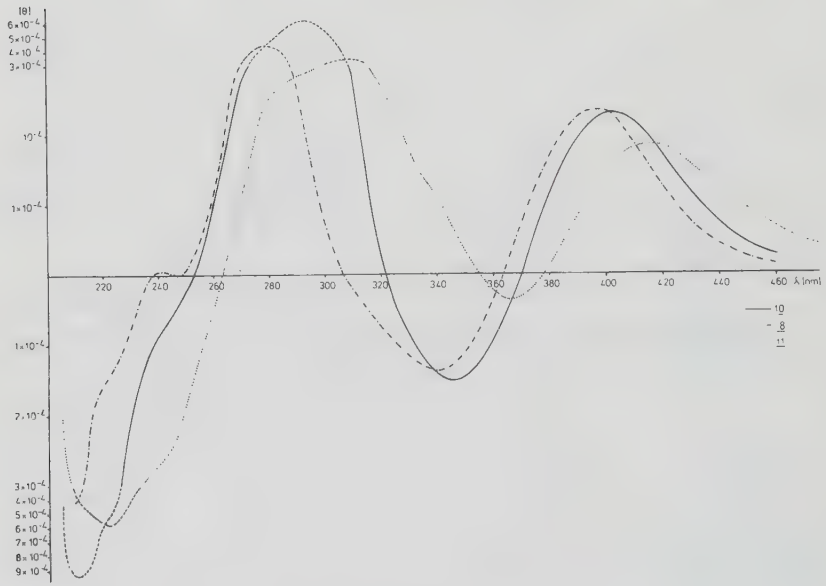


Abb. 22: CD-Spektren der Testosteron-π-allylpalladium-komplexe: Chlorid 8, Bromid 10, Jodid 11 in Dioxan

Bei dem darauffolgenden Minima im Bereich von 335 bis 365 nm ergeben sich nur beim Bromidkomplex 9 und beim Jodidkomplex 10 nennenswerte Verschiebungen. Auffallend ist, daß beim Chlorid-Pyridinkomplex 13 zum CD-Minimum bei 335 nm kein zugehörendes Maximum im UV/Vis-Spektrum, sondern ein Minimum vorhanden ist.

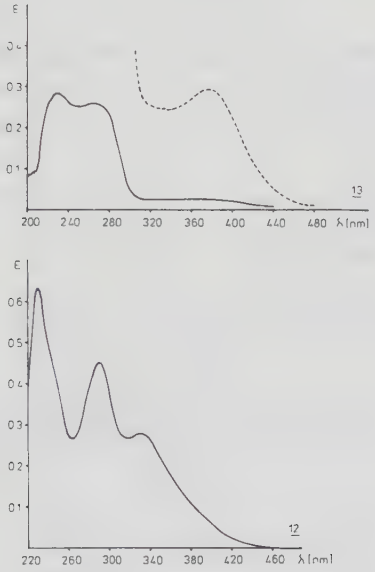


Abb. 23: UV/Vis-Spektren der Testosteron-π-allylpalladium-komplexe: Thiocyanat 12 und Chlorid-Pyridin 13 in Dioxan

Die anschließenden Maxima steigen in der Reihe Chlorid 8, Bromid 10 und Jodid 11 von 278 bis 308 nm; die Differenz beträgt also 14 nm. Der Thiocyanatkomplex 12 hat dabei fast dasselbe Maximum wie der Chloridkomplex 8, der Chlorid-

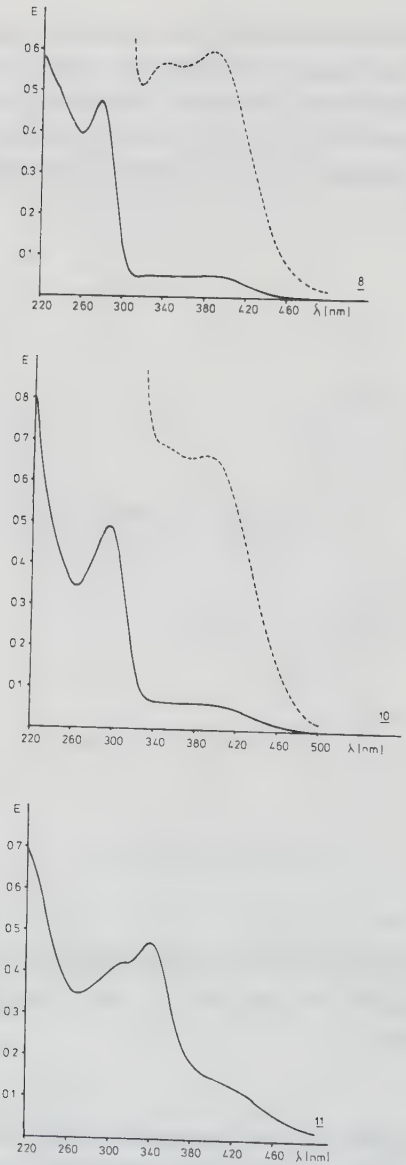


Abb. 24: UV/Vis-Spektren der Testosteron-π-allalypalladium-komplexe: Chlorid 8, Bromid 10, Jodid 11 in Dioxan

Pyridinkomplex 13 dasselbe wie der Bromidkomplex 10. Bei den bis jetzt beschriebenen Cottoneffekten handelt es sich um n → π*-Übergänge.

Es folgen dann beim Thiocyanatkomplex 12 ein weiteres Minimum bei 252 nm, beim Chlorid-Pyridinkomplex 13 zwei weitere Minima bei 267 nm und 255 nm. Diese negativen Cottoneffekte sind in den CD-Spektren der Halogenidkomplexe 8, 10 und 11 nicht vorhanden.

Tab. 10: Maxima und Molextinktionen aus den UV-Vis-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 12 und 13

Testo PdSCN 12				Testo PdClPyr 13			
UV		CD		UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
		375	+23600	375	600	380	+23000
		347	± 0			353	± 0
331	5600	335	- 5500	Min.	333	335	-12900
		320	± 0			318	± 0
289	9000	278	+26900			294	+18200
		256	± 0			280	± 0
		252	- 1900	267	5200	267	-39600
		248.5	± 0			255	-30400
230	12800	233	+18800			240	-43600
		227.5	± 0	228	5600	220	- 9200
		215	-33600				

Es folgen dann die π → π*-Übergänge im Bereich von 240 nm. Bemerkenswert sind dabei die verschiedenen Vorzeichen. Während beim Chloridkomplex 8 ein schwach positiver Cottoneffekt vorliegt, liegen bei den Bromid- und Jodidkomplexen 9 und 10

Tab. 11: Maxima und Molextinktionen aus den UV/Vis-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 8, 10 und 11

Testo PdCl 8				Testo PdBr 10			
UV		CD		UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
389	1200	396	+23500	390	1300	403	+22800
		363	± 0			370	± 0
340	1000	339	-13500	353	1400	346	-15000
		307.5	± 0			322	± 0
277	10000	280	+43800	295	10000	294	+61400
		247.5	± 0			252.5	± 0
240	8200	241	± 530			238	-13000
220	11600	210	-40900	220	16000	212	-93000

Testo PdJ 11			
UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
422	2400	415	+18400
		377.5	± 0
338	9400	365	- 3400
		355	± 0
308	8400	308	+33700
		264	± 0
		242	-27100
220	13600	223	-58100

negative Cottoneffekte mit stark steigendem Betrag der molaren Elliptizität vor. Der Thiocyanatkomplex 12 hat einen positiven Cottoneffekt mit hoher Intensität, während der Cottoneffekt des Chlorid-Pyridinkomplexes 13 an dieser Stelle ein negatives Vorzeichen mit hoher molarer Elliptizität hat. Der folgende energiereiche Übergang hat in allen Fällen negatives Vorzeichen und außer beim Chlorid-Pyridinkomplex 13 eine hohe molare Elliptizität.

Aus der Literatur sind die CD-Spektren einiger π-Allylpalladiumkomplexe von 4-En-3-ketosteroiden bekannt[84].

1.5.3. Die ^{13}C-NMR-Spektren der π-Allylpalladiumkomplexe von Testosteron und Progesteron 8, 8a, 9, 10, 11, 13 und die ^{1}H-NMR-Spektren von 8, 11 und 13

Die ^{13}C-NMR-Messungen werden wie die ^{1}H-NMR-Messungen wenn möglich in $CDCl_3$ durchgeführt. In einigen Fällen ergeben sich aber Löslichkeitsprobleme, d.h. die Komplexe kristallisieren besonders in höheren Konzentrationen spontan aus Chloroform bzw. $CDCl_3$ unter Einschluß von Lösungsmittelmolekülen aus (siehe IR-Spektrum). Als Ausweichlösungsmittel wird daher Dioxan d_8 eingesetzt, da in diesem Lösungsmittel wahrscheinlich kein Ligandenaustausch eintritt, oder sich zumindest nicht in den chemischen Verschiebungen bemerkbar macht. Dagegen kommt es mit Dimethylsulfoxid bzw. ^{12}C-DMSO d_6 sicher zu einem Ligandenaustausch[85].

Die protonenbreitbandentkoppelten Spektren der Testosteron- bzw. Progesteronkomplexe zeigen 19 bzw. 21 Signale. Die Komplexmoleküle sind also chemisch und stereochemisch einheitlich; es liegen keine Gemische von α- und β-Diastereomeren vor. Außerdem sind in Lösung keine stereochemischen Unterschiede der Steroidteilmoleküle im dimeren Komplex vorhanden, wie sie im Kristall mit der Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden können (s.u.).

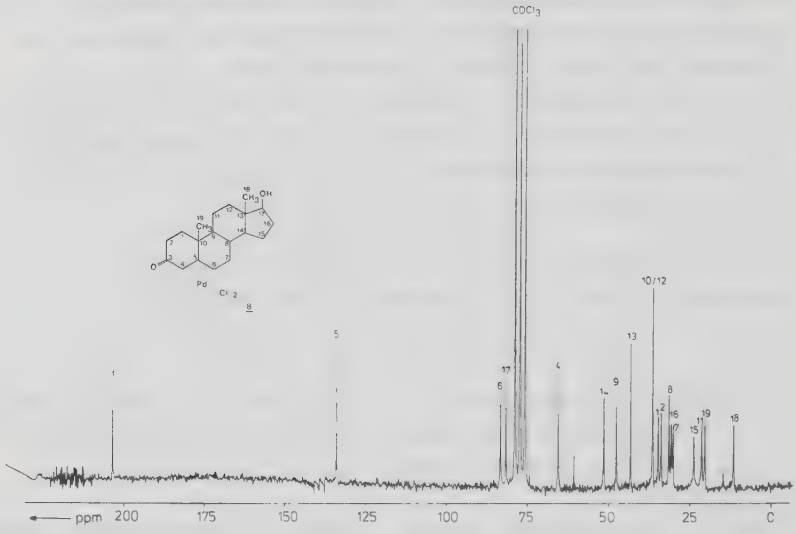


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Spektrum (protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz; 125 388 Pulsinterferogramme) von Testosteron-π-allylpalladiumchlorid 8; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$

Da die C-Atome des C- und D-Ringes außerhalb der Einflußsphäre der Komplexierung liegen, ist die Zuordnung ihrer Signale durch Vergleich mit denen des Ausgangssteroids[88,113], dessen Spektrum jeweils im selben Lösungsmittel gemessen wird, leicht möglich. Erwartungsgemäß erfahren die drei an der Komplexbildung beteiligten C-Atome C4, C5 und C6 die größten Änderungen der chemischen Verschiebung. Das Problem wird zunächst beim Testosteronkomplex 8, gemessen in $CDCl_3$, diskutiert. Das quartäre C5 hat eine chemische Verschiebung von 134.0 und damit ein Hochfeldverschiebungsinkrement von -37.1 ppm.

Nicht ganz eindeutig ist die Zuordnung der Signale 65.2 und 83.0 ppm zu den C-Atomen C4 und C6. Die wichtigsten Argumente für die jeweilige Zuordnung werden einander gegenübergestellt. Folgende Argumente sprechen für die Zuordnung 83.0 ppm zu C4 und 65.2 ppm zu C6. Ohne die Carbonylgruppe an C3 müßten C4 und C6 im Trihaptokomplex die gleiche chemische Verschiebung haben. Beim dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplex haben die entsprechenden äußeren C-Atome beide die chemische Verschiebung 63.2 ppm, das mittlere C-Atom, das C5 beim Steroidkomplex entspricht, hat den Wert 111.9 ppm[86,87]. Durch die elektronenziehende Carbonylgruppe an C3 würde man auch für C4 eine geringere Elektronendichte erwarten, was zu einer Entschirmung und damit zu einer Tieffeldverschiebung führen würde. Diese Verhältnisse trifft man tatsächlich beim unkomplexierten 17β-Hydroxy-5α-androstan-3-on an: Hier hat C4 den Wert 44.6, C6 den Wert 28.9 und C5 den Wert 46.8 ppm[88].

Folgende Argumente sprechen für die Zuordnung 83.0 ppm zu C6 und 65.2 ppm zu C4 wie sie von der australischen Arbeitsgruppe getroffen wurde[15,82]. Bei ^{13}C-NMR-Untersuchungen zum Mechanismus der Komplexbildung mit dem π-Allylpalladiumchloridkomplex von 6α-deuteriertem Cholest-4-en-3-on ist die Intensität des C6-Signals bei 83.6 ppm deutlich vermindert[78]. Im Gegensatz zum ^{13}C-NMR-Spektrum kann man im Protonenresonanzspektrum H4 und H6 durch die Multiplizität unterscheiden. H4 zeigt ein Singulett mit 3.43 ppm, H6 wegen der Kopplung mit H7α und H7β ein doppeltes Duplett mit einem Wert von 4.38 ppm[73,79,89]. Die eigenen Messungen liegen beim Komplex 8 mit 3.39 und 4.35 ppm im gleichen Bereich; auch die Werte des monomeren Chlorid-Pyridinkomplexes 13 sind analog. Beim π-Allylpalladiumchloridkomplex von Cholest-4-en beträgt die chemische Verschiebung für beide Protonen 3.76 ppm[72].

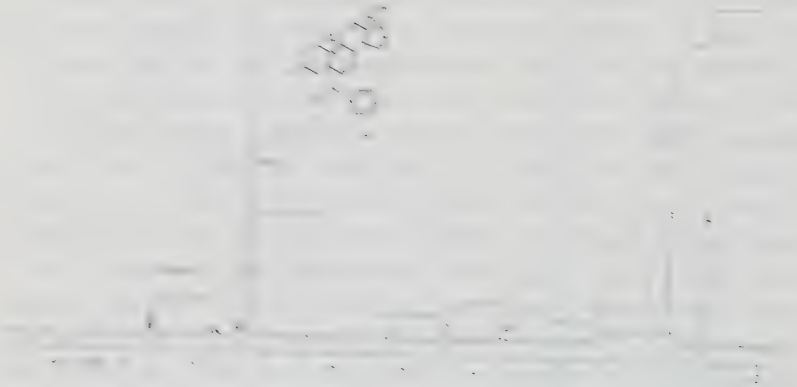


Abb. 2c: ^{1}H-NMR-Spektrum (80 MHz) von Testosteron-π-allyl-palladiumchlorid-pyridin 13 in $CDCl_3$

Beim 3-Cl-Komplex hat also H6 den höheren ppm-Wert. Trifft man die Zuordnung nach der Regel, daß die Resonanzpositionen von ^{13}C-Kernen und den daran gebundenen Protonen häufig Parallelen aufweisen[20], so kann man die ^{13}C-Zuordnung analog mit eindeutiger ^{1}H-Zuordnung treffen. Auch die Regioselektivität bei der allylischen Alkylierung kann als Argument herangezogen werden. In allen Reaktionsansätzen wird nur das 6β-Produkt, nie das 4-substituierte Produkt mit einer C5-C6-Doppelbindung gefunden. Das bedeutet, daß die Elektronendichte an C6 geringer ist als an C4 und daher dem nukleophilen Angriff des Carbanions leichter zugänglich ist. Andererseits könnte auch ein zunächst entstehendes 4-substituiertes Produkt zum 6-substituierten umlagern. Insgesamt überwiegen also die Argumente für eine Zuordnung von 81.4 ppm zu C6.

Während die Zuordnung der Signale für C3 im tiefen Feld und für C19 im hohen Feld einfach ist, lassen sich die restlichen Signale des A- und B-Ringes: C1, C2, C7, C8, C9 und C10 im protonenbreitbandentkoppelten Spektrum nicht ohne weiteres zuordnen. Der Wert 47.3 ppm wird C9 zugeordnet, da er im Off-resonance-Spektrum als Dublett erscheint. Das Signal bei 36.1 ppm fällt bei 8 mit dem Signal von C12 zusammen. Im Spektrum des Progesteronkomplexes 9 ist es gut vom C12-Signal getrennt. Nach der Intensität im Off-resonance-Spektrum handelt es sich um ein Singulett und nicht um ein Triplett und wird daher C10 zugeordnet. Die Zuordnung von C8 ist schwierig, da im mittleren Hochfeldbereich die Signale der alicyclischen CH_2- und CH-Gruppen sehr eng beieinander liegen und sich die Multipletts des Off-resonance-Spektrums überlagern. Durch das Spin-Echo-Spektrum, bei dem sich CH und CH_2 durch Vorzeichenwechsel unterscheiden, läßt sich eine eindeutige Zuordnung treffen. Mit dieser Methode hat C8 beim monomeren Palladiumchloridpyridinkomplex 13 den Wert 31.0 ppm entsprechend 31.1 ppm bei 8. Durch dieses Spektrum werden auch die Zuordnungen von C9 (46.5 ppm) und C10 (35.8 ppm) bestätigt. Beim Komplex 13 unterscheiden sich die Signale von C6 und C17 nur um 0.2 ppm. Das Signal mit der geringeren Intensität wird C17 zugeordnet. Aus methodischen Gründen hat das Signal für die Pyridin-C-Atome 2' und 6' negatives statt positives Vorzeichen.

Im folgenden werden die Argumente für die beiden möglichen Zuordnungen von C7 und C1 einander gegenübergestellt. Für die Zuordnung 34.4 ppm zu C7 und 29.8 ppm zu C1 sprechen folgende Argumente: C3 und C7 sind die beiden C-Atome, die dem Komplexzentrum benachbart sind. Wenn man mit dem 4-En-3-ketosteroid Testosteron vergleicht, erfährt C3 eine Tieffeldverschiebung von + 4.0 ppm, C7 dann eine solche von + 2.9 ppm. Auch Senda et al.[91] finden beim endocyclischen π-Allylpalladiumchloridkomplex von Cyclohexan für das dem Komplexzentrum benachbarte C-Atom eine Verschiebung von

+ 3.3 ppm. C1 und C9 sind ebenfalls vom Komplexzentrum gleich weit entfernt. Beide haben ein axial-α-ständiges H-Atom. Beim Komplex 8 beträgt das Inkrement für C9 - 6.6 ppm, für C1 bei dieser Argumentation - 5.8 ppm. Es ist dabei allerdings zu beachten, daß C1 noch ein zusätzliches äquatoriales β-ständiges C-Atom trägt und bei der umgekehrten Zuordnung ebenfalls eine Hochfeldverschiebung (- 1.2 ppm) erfährt.

Für die Zuordnung 29.8 ppm zu C7 und 34.4 ppm zu C1 sprechen folgende Argumente: Es ist realistischer in bezug auf die Zuordnungen den Komplex nicht mit dem Ausgangssteroid zu vergleichen, sondern die Inkremente mit dem entsprechenden 17β-Hydroxy-5α-androstan-3-on (Dihydrotestosteron)[88], das die C4-C5-Doppelbindung nicht enthält, zu bilden. Alle drei an der Komplexbildung beteiligten C-Atome erfahren dann eine große Tieffeldverschiebung. C3 erfährt jetzt eine Hochfeldverschiebung von - 8.1 ppm, während beim Vergleich mit Testosteron eine Tieffeldverschiebung von + 4.0 ppm resultiert (s.o.). Da aber C3 und C7 als direkte Nachbarn der am Trihaptokomplex beteiligten C-Atome C4, C5 und C6 prinzipiell gleich beeinflußt werden, sollte auch C7 eine Hochfeldverschiebung erfahren. Da die chemische Verschiebung beim Carbonylkohlenstoff C3 einen größeren Betrag hat als von C7 wird auch das Inkrement bei C3 größer sein. Das Inkrement von C7 beträgt somit - 1.5 ppm. Für C1 ergibt sich dann ein Inkrement von - 4.2 ppm.

Verschiedene Komplexliganden werden sich auf C7 stärker auswirken als auf C1. So wird im DMSO-Komplex 8a C7 um 2.1 ppm stärker hochfeldverschoben als im dimeren Palladiumchloridkomplex 8; dagegen wird C1 nur um 1.1 ppm stärker hochfeldverschoben. Zwischen dem monomeren Komplex 13 und dem dimeren Komplex 8 ergeben sich bei diesen beiden Signalen jedoch keine Unterschiede.

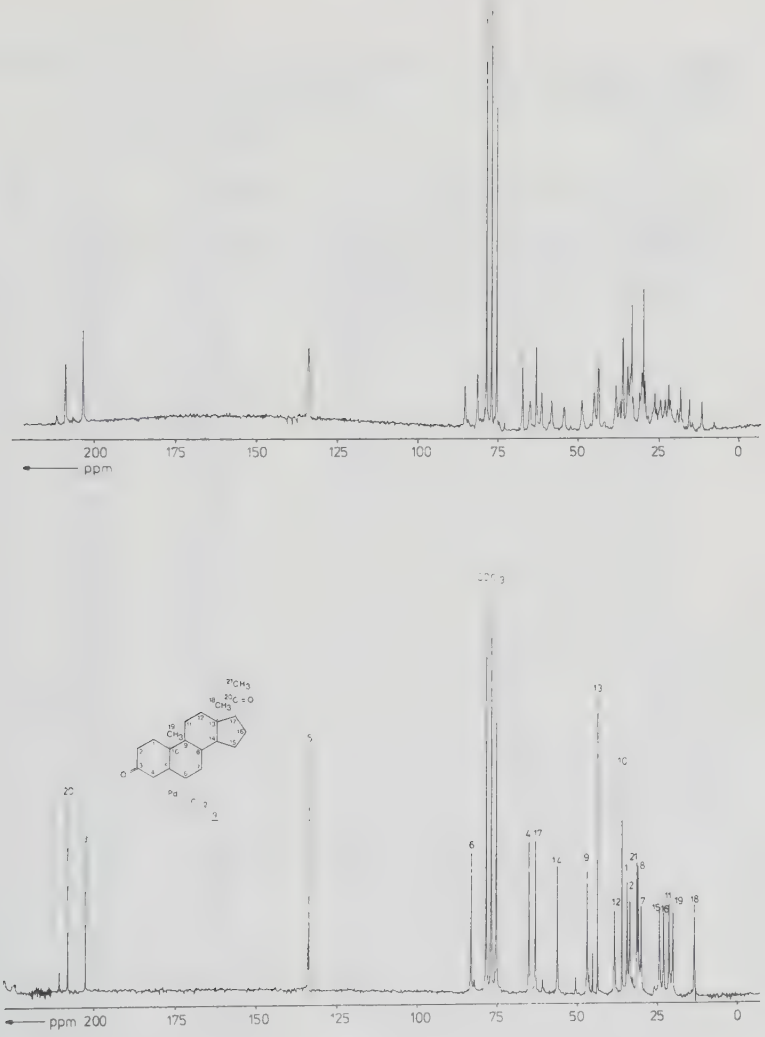


Abb. 27: ^{13}C-NMR-Spektren (20.115 MHz) von Progesteron-π-allylpalladiumchlorid 9; ca. 150 mg in 1 ml $CDCl_3$.
Oben: Off-resonance-Spektrum (129 109 Pulsinterferogramme); Singuletts für quartäre, Dubletts für teritäre, Tripletts für sekundäre, Quartetts für primäre C-Atome.
Unten: Protonenbreitbandentkoppeltes Spektrum (132 232 Pulsinterferogramme)

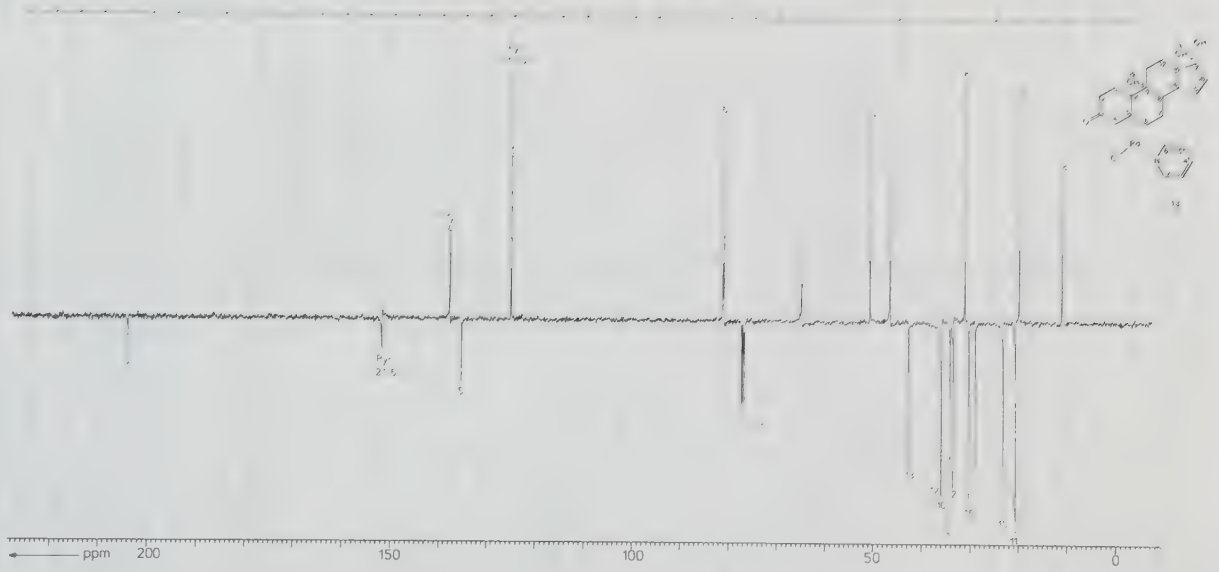


Abb. 28: ^{13}C-NMR-Spektrum (Spin-Echo: Programm J-Mod; 100 MHz; 1445 Pulsinterferogramme) von Testosteron-π-allylpalladiumchlorid-pyridin 13; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$. Positive Signale: primäre und tertiäre C-Atome; negative Signale: sekundäre und quartäre C-Atome; Ausnahme Pyr C2'/C6'

Tab. 12: ^{13}C-chemische Verschiebungen (ppm) der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 8 und 13 in $CDCl_3$, sowie von 8a in DMSO d6

C-Atom	Testo $CDCl_3$	TestoPdCl 8 $CDCl_3$	TestoPdClPyr 13 $CDCl_3$	Testo DMSOd6	TestoPd(DMSO)$_2$ 8a DMSOd6
1	35.6	34.4	34.1	35.1	33.0
2	33.9	33.5	33.4	33.5	33.0
3	199.4	203.4	204.5	197.5	202.9
4	123.8	65.2	65.0	123.0	68.5
5	171.1	134.0	135.4	170.6	139.4
6	32.7	83.0	81.1	31.9	89.2
7	31.5	29.8	28.8	31.3	27.7
8	35.6	31.1	31.0	35.1	30.4
9	53.9	47.3	46.5	53.5	46.4
10	38.6	36.1	35.8	38.1	35.4
11	20.6	20.8	20.6	20.2	20.1
12	36.4	36.1	35.9	36.3	35.9
13	42.8	42.8	42.6	42.3	42.2
14	50.5	51.1	50.6	50.0	50.5
15	23.2	23.2	23.1	23.0	22.7
16	30.4	30.4	30.2	29.8	29.6
17	81.5	81.4	81.3	79.7	79.6
18	11.0	11.0	10.9	11.1	11.0
19	17.3	19.9	19.8	16.9	19.1
Pyr. (2,6)			152.0		
Pyr.(4)			138.0		
Pyr. (3,5)			125.2		

Tab. 13: ^{13}C-chemische Verschiebungen (ppm) der Testosteron-π-allylpalladiumhalogenidkomplexe 8, 10 und 11 in Dioxan d8, sowie des Progesteron-π-allylpalladium-chloridkomplexes 9 in $CDCl_3$

C-Atom	Testo	TestoPdCl 8	TestoPdBr 10	TestoPdJ 11	Prog	ProgPdCl 9
	Diox.d8	Diox.d8	Diox.d8	Diox.d8	$CDCl_3$	$CDCl_3$
1	36.3	35.1	34.9	32.9	35.6	34.3
2	34.2	33.7	33.8	32.6	33.8	33.5
3	197.8	202.5	201.0	200.5	199.0	203.2
4	124.4	66.1	65.0	63.4	123.8	65.1
5	170.0	134.8	133.8	134.4	170.7	133.8
6	33.0	83.2	84.6	88.6	32.6	83.2
7	32.4	30.5	31.1	30.0	31.8	30.0
8	36.3	31.9	32.1	31.2	35.4	31.0
9	54.8	48.1	48.1	46.4	53.5	46.9
10	39.0	36.6	36.7	35.6	38.4	35.9
11	21.2	21.5	21.6	20.6	20.9	21.1
12	37.3	37.1	37.3	36.2	38.4	38.2
13	43.4	43.4	43.6	42.5	43.7	43.6
14	51.3	52.0	52.3	51.2	55.8	56.3
15	23.9	23.7	24.0	22.9	24.2	24.2
16	30.8	30.9	31.1	30.8	22.7	22.9
17	81.3	81.3	80.3	80.3	63.3	63.1
18	11.4	11.3	11.5	10.3	13.1	13.2
19	17.3	19.7	19.9	19.1	17.2	19.8
20					208.9	208.8
21					31.3	31.4

Tab. 14: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 8, 8a und 13; berechnet als Differenz der chemischen Verschiebungen von Testosteron und von 8, 8a und 13

C-Atom	TestoPdCl 8	TestoPd(DMSO)$_2$ 8a	TestoPdClPyr 13
1	- 1.2	- 1.8	- 1.5
2	- 0.4	- 0.1	- 0.4
3	+ 4.0	+ 5.4	+ 5.1
4	-58.6	-54.5	-58.8
5	-37.1	-31.2	-35.7
6	+50.3	+57.3	+48.4
7	- 1.7	- 3.6	- 2.7
8	- 4.5	- 4.7	- 4.6
9	- 6.6	- 7.1	- 7.4
10	- 2.5	- 2.7	- 2.8
19	+ 2.6	+ 2.2	+ 2.5

Tab. 15: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente der Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplexe 8 und 13; berechnet als Differenz der chemischen Verschiebungen von 17β-Hydroxy-5α-androstan-3-on (Dihydrotestosteron)[88] und von 8 bzw. 13

C-Atom	Dihydrotesto - 8	Dihydrotesto - 13
1	- 4.2	- 4.1
2	- 4.6	- 4.7
3	- 8.1	- 7.0
4	+20.6	-20.4
5	+87.2	+88.6
6	+54.1	+52.2
7	- 1.5	- 2.5
8	- 4.4	- 4.5
9	- 6.7	- 7.5
10	+ 0.3	0.0
19	+ 8.4	+ 8.3

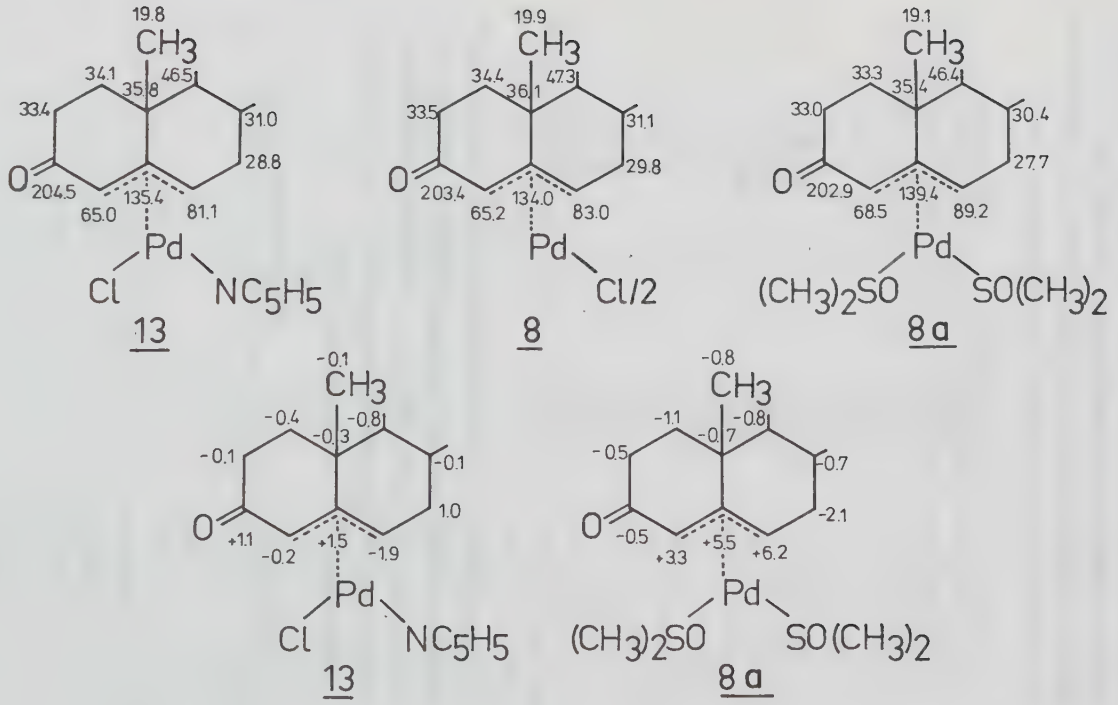


Abb. 29: ^{13}C-Zuordnungen (nach Tab. 12) und Verschiebungsinkremente (nach Tab. 14) der Testosteron-π-allylpalladiumkomplexe 8, 8a und 13

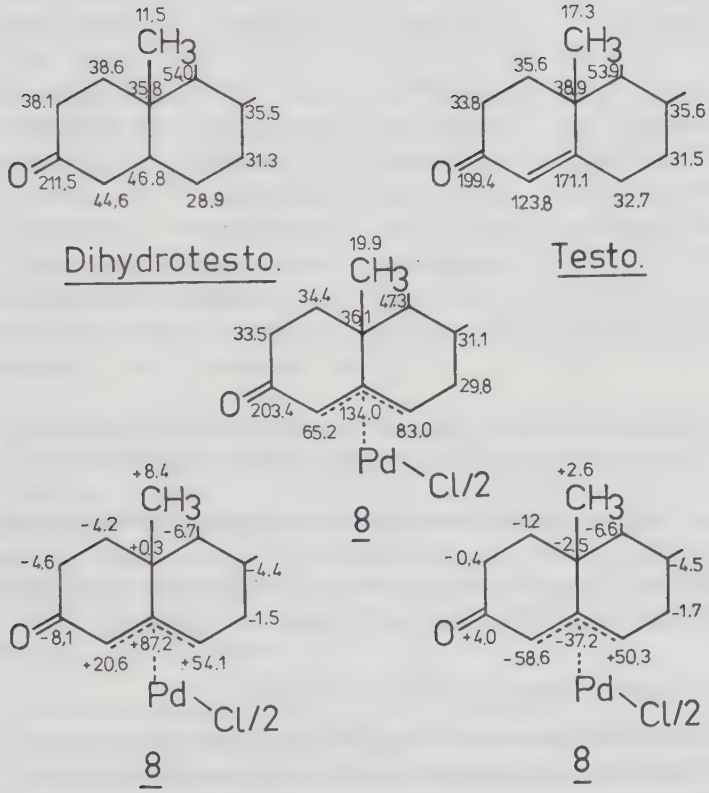


Abb. 30: ^{13}C-Zuordnungen (nach Tab. 12) und Verschiebungsinkremente (nach Tab. 15 bzw. 14) des Testosteron-π-allylpalladiumchlorid-Komplexes 8

Tab. 16: Die wichtigsten chemischen Verschiebungen (ppm) in den ^{1}H-NMR-Spektren der Testosteron-π-allyl-palladiumkomplexe 8, 11 und 13

	Testo	TestoPdCl 8	TestoPdJ 11	TestoPdClPyr 13
H18	0.75(s;3H)	0.77(s;3H)	0.74(s;3H)	0.76(s;3H)
H19	1.15(s;3H)	1.27(s;3H)	1.22(s;3H)	1.30(s;3H)
H 4	5.67(s;1H)	3.39(s;1H)	3.43(s;1H)	3.40(s;1H)
H17α	3.62(t;1H)	3.65(t;1H)	3.62(t;1H)	3.67(t;1H)
H 6		4.35(d;1H)	4.52(d;1H)	4.39(d;1H)
		J = 5.9 Hz	J = 5.6 Hz	J = 5.2 Hz

1.6. Die Röntgenstrukturanalyse von Bis(17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8[92,93]

Aus der Literatur sind schon viele Röntgenstrukturanalysen von π-Allylpalladiumchloridkomplexen von einfachen Olefinen bekannt. Eine Übersicht findet man im Cambridge Crystallographic Data File (Ausgabe Jan. 1980), s. auch Lit.[94].

1.6.1. Kristallzüchtung und Kristalldaten

Am Beginn jeder Röntgenstrukturanalyse steht die Züchtung eines geeigneten Einkristalls. Für den besonderen Fall eines dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexes kommen nur verhältnismäßig unpolare Lösungsmittel in Frage. Bei Verwendung von bestimmten polaren Lösungsmitteln können durch Ligandenaustausch die monomeren π-Allylpalladiumkomplexe entstehen, wobei mindestens ein Chloridrest durch einen neuen Liganden ersetzt wird. Auf diese Weise wird der entsprechende Chlorid-Pyridin-(13) und der Dimethylsulfoxid-(8a)-Komplex gebildet (s.o.). Andererseits werden auch unpolare Lösungsmittel oft in den Kristallaufbau mit einbe-

zogen. Diese zusätzlichen Daten erschweren dann die Röntgenstrukturanalyse. Wie oben erwähnt, zerfallen die in Ethylacetat, einem Lösungsmittel mittlerer Polarität, gebildeten Kristalle außerhalb des Lösungsmittels zu einem mikrokristallinen Pulver. Aus Chloroform bilden sich nur kleine unbrauchbare Kristalle. Auch die Dampfdiffusion von n-Hexan in Chloroformlösungen des Komplexes bringt wegen des niederen Siedepunkts von Chloroform keine Abhilfe. Ein Chlorkohlenwasserstoff mit höherem Siedepunkt führt zum gewünschten Erfolg: Durch Dampfdiffusion von n-Hexan in eine Lösung des Komplexes in 1,2-Dichlorethan erhält man gut ausgebildete Einkristalle. Die so gewonnenen Kristalle enthalten noch Lösungsmittelmoleküle und sind über mehrere Tage nur in Gegenwart des Lösungsmittelgemisches in einer zugeschmolzenen Lindemann-Kapillare beständig.

In den folgenden Tabelle sind die Bindungsabstände (Tab. 18), die Bindungswinkel (Tab. 19) und die Torsionswinkel (Tab. 20) aufgeführt. Diese Daten bilden die Grundlage für die Diskussion der Molekülstruktur des dimeren Komplexes 8.

Die Röntgenstrukturanalyse von 8 wurde von P. Hütter und W. Winter am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, durchgeführt.

Der Komplex kristallisiert in der Raumgruppe $P2_1$ mit Z = 2, vier 1,2-Dichlorethanmolekülen und zwei Wassermolekülen pro Elementarzelle. Die wichtigsten Kristalldaten und Datensammlungsparameter sind in Tab. 17 zusammengestellt. Sie beziehen sich auf eine Messung mit MoK_α-Strahlung. Weitere technische Daten sind in der zitierten Literatur zu finden.

Tab. 17: Kristalldaten und Datensammlungsparameter

Summenformel	$C_{38}H_{54}Pd_2Cl_2O_4 \times 2\ C_2H_4Cl_2 \times H_2O$
Zellkonstanten	a = 11.693(2) Å
	b = 13.660(2) Å
	c = 15.445(2) Å
	β = 109.18(1)
Elementarzellvolumen	2330 $Å^3$
Raumgruppe	$P2_1$
Absorptionskoeffizient	6.2 mm^{-1}
Meßbereich in 2 Θ	6 - 52°
maximale Meßzeit pro Reflex	30 sec
Scan-Breite ($\Delta\omega$; ω/Θ-Scan)	(1.0 + 0.35 tan Θ)°
Zahl der symmetrie-unabhängigen Reflexe mit F_o	4533
R	0.0359
$R_G[\Sigma_w\Delta^2/\Sigma_w F_o^2]^{0.5}$	0.0384 (Einheitsgewichte)

Tab. 18: Bindungsabstände [Å] in den Steroidteilmolekülen K1 und K2 von 8. (Die geschätzten Standardabweichungen in Klammern beziehen sich auf die letzte Ziffer). Die Lagen der Dichlorethanatome wurden mit sog. "slack constraints" verfeinert[97], wobei als Bedingungen C-C- und C-Cl-Abstände von 1.54 und 1.77 Å mit σ = 0.01 Å gewählt wurden.

Teilmolekül K1		Teilmolekül K2	
Pd1-Cl1	2.381(2)	Pd2-Cl1	2.394(2)
Pd1-Cl2	2.406(2)	Pd2-Cl2	2.390(2)
Pd1-C4	2.097(9)	Pd2-C24	2.099(8)
Pd1-C5	2.135(8)	Pd2-C25	2.128(7)
Pd1-C6	2.174(7)	Pd2-C26	2.152(6)
C1-C2	1.52(1)	C21-C22	1.51(1)
C1-C10	1.56(1)	C21-C30	1.56(1)
C2-C3	1.50(1)	C22-C23	1.46(2)
C3-O3	1.21(1)	C23-O23	1.23(1)
C3-C4	1.46(1)	C23-C24	1.46(1)
C4-C5	1.42(1)	C24-C25	1.42(1)
C5-C6	1.40(1)	C25-C26	1.41(1)
C5-C10	1.50(1)	C25-C30	1.52(1)
C6-C7	1.49(1)	C26-C27	1.51(1)
C6-C7	1.49(1)	C27-C28	1.53(1)
C8-C9	1.55(1)	C28-C29	1.55(1)
C8-C14	1.50(1)	C28-C34	1.49(1)
C9-C10	1.55(1)	C29-C30	1.56(1)
C9-C11	1.52(1)	C29-C31	1.53(1)
C10-C19	1.55(1)	C30-C39	1.51(1)
C11-C12	1.54(1)	C31-C32	1.51(1)
C12-C13	1.52(1)	C31-C32	1.51(1)
C13-C14	1.53(1)	C33-C34	1.52(1)
C13-C17	1.54(1)	C33-C37	1.53(1)
C13-C18	1.54(1)	C33-C38	1.50(1)

Fortsetzung der Tabelle 18

Teilmolekül K1		Teilmolekül K2	
C14-C15	1.55(1)	C34-C35	1.52(1)
C15-C16	1.53(1)	C35-C36	1.53(2)
C16-C17	1.51(1)	C36-C37	1.52(2)
C17-O17	1.42(1)	C37-O37	1.42(1)
C200-C210	1.52(2)	C300-C310	1.53(3)
C200-C120	1.75(1)	C300-C130	1.78(2)
C210-C121	1.78(2)	C310-C131	1.73(3)

Tab. 19: Bindungswinkel in den Steroidteilmolekülen K1 und K2 von 8 [°]. Die geschätzten Standardabweichungen beziehen sich auf die letzte Ziffer.

Teilmolekül K1		Teilmolekül K2	
Cl1-Pd1-C12	88.5(1)	Cl1-Pd2-C12	88.5(1)
Pd1-Cl1-Pd2	83.2(1)	Pd1-C12-Pd2	52.8(1)
C2-C2-C10	113.5(6)	C22-C21-C30	113.3(8)
C1-C2-C3	116.0(7)	C21-C22-C23	115.8(8)
C2-C3-C4	118.0(7)	C22-C23-C24	118.0(7)
C2-C3-O3	120.9(7)	C22-C23-O23	121.2(7)
C4-C3-O3	121.1(7)	C24-C23-O23	120.9(8)
C3-C4-C5	122.0(7)	C23-C24-C25	122.4(7)
C4-C5-C6	114.2(7)	C24-C25-C26	114.7(7)
C4-C5-C10	121.4(6)	C24-C25-C30	120.7(6)
C6-C5-C10	123.3(6)	C26-C25-C30	123.6(7)
C5-C6-C7	122.6(7)	C25-C26-C27	121.5(7)
C6-C7-C8	113.3(6)	C26-C27-C28	115.5(7)
C7-C8-C9	109.9(5)	C27-C28-C29	109.4(5)
C7-C8-C14	111.5(6)	C27-C28-C34	111.3(7)
C9-C8-C14	109.9(6)	C29-C28-C34	111.0(7)

Fortsetzung der Tabelle 19

Teilmolekül K1		Teilmolekül K2	
C8-C9-C10	110.6(5)	C28-C29-C30	112.0(7)
C8-C9-C11	113.4(5)	C28-C29-C31	113.4(6)
C10-C9-C11	113.6(6)	C30-C29-C31	112.5(7)
C1-C10-C5	109.1(5)	C21-C30-C25	108.2(6)
C1-C10-C9	109.3(5)	C21-C30-C29	108.7(7)
C5-C10-C9	111.0(6)	C25-C30-C29	108.9(6)
C1-C10-C19	109.7(6)	C21-C30-C39	110.5(7)
C5-C10-C19	105.4(6)	C25-C30-C39	106.9(9)
C9-C10-C19	112.3(6)	C29-C30-C39	113.5(7)
C9-C11-C12	115.5(7)	C29-C31-C32	113.7(8)
C11-C12-C13	110.4(6)	C31-C32-C33	110.3(8)
C12-C13-C14	107.0(5)	C32-C33-C34	106.7(6)
C12-C13-C17	115.7(6)	C32-C33-C37	113.3(8)
C14-C13-C17	100.4(6)	C34-C33-C37	100.2(7)
C12-C13-C18	111.2(7)	C32-C33-C38	109.5(8)
C14-C13-C18	113.5(6)	C34-C33-C38	115.4(9)
C17-C13-C18	108.7(6)	C37-C33-C38	111.5(7)
C8-C14-C13	114.1(6)	C28-C34-C33	114.8(7)
C8-C14-C15	118.8(6)	C28-C34-C35	121.5(7)
C13-C14-C15	104.2(6)	C33-C34-C35	102.9(6)
C14-C15-C16	103.7(6)	C34-C35-C36	104.6(8)
C15-C16-C17	107.5(6)	C35-C36-C37	106.1(7)
C13-C17-C16	104.8(6)	C33-C37-C36	103.1(9)
C13-C17-O17	116.2(7)	C33-C37-O37	115.7(8)
C16-C17-O17	111.6(6)	C36-C37-O37	112.1(6)

Tab. 20: Vergleich der Torsionswinkel von Testosteron[96] mit denen des Testosteron-π-allylpalladiumchlorid-komplexes 8. T1 und T2 sind symmetrieunabhängige Testosteronkonformere. Die beiden Steroidteilmoleküle von 8 werden mit K1 (C1-C19) und mit K2 (C21-C39) bezeichnet.

	T1	T2	K1	K2
Ring A				
C5-C10-C1-C2	47.8	47.3	51.3	52.2
C10-C1-C2-C3	-55.7	-54.1	-42.6	-47.8
C1-C2-C3-C4	33.4	29.2	11.9	17.9
C2-C3-C4-C5	- 5.2	0.0	8.9	5.1
C3-C4-C5-C10	- 1.8	- 5.1	3.0	2.9
C4-C5-C10-C1	-19.6	-18.5	-32.5	-30.7
Ring B				
C9-C10-C5-C6	44.9	45.0	14.0	19.1
C10-C5-C6-C7	-48.1	-50.1	3.7	2.4
C5-C6-C7-C8	53.6	54.4	12.4	8.0
C6-C7-C8-C9	-58.7	-56.5	-44.8	-39.0
C7-C8-C9-C10	57.6	54.5	63.2	62.4
C8-C9-C10-C5	-49.4	-46.8	-46.4	-51.3
Ring C				
C14-C8-C9-C11	-50.1	-53.2	-44.8	-45.8
C8-C9-C11-C12	49.9	52.2	43.9	48.0
C9-C11-C12-C13	-53.4	-54.4	-51.3	-54.7
C11-C12-C13-C14	57.1	56.4	58.0	58.7
C12-C13-C14-C8	-61.5	-61.4	-64.4	-60.7
C13-C14-C8-C9	57.6	59.7	56.9	54.7
Ring D				
C17-C13-C14-C15	46.0	45.8	43.4	46.8 (ϕ_0)
C13-C14-C14-C16	-32.7	-35.2	-30.5	-31.9 (ϕ_4)
C14-C15-C16-C17	6.2	10.1	5.1	4.2 (ϕ_3)
C15-C16-C17-C13	22.4	18.5	21.9	24.6 (ϕ_2)
C16-C17-C13-C14	-41.6	-38.9	-40.1	-43.9 (ϕ_1)

1.6.2. Die Diskussion der Molekül- und Kristallstruktur von 8

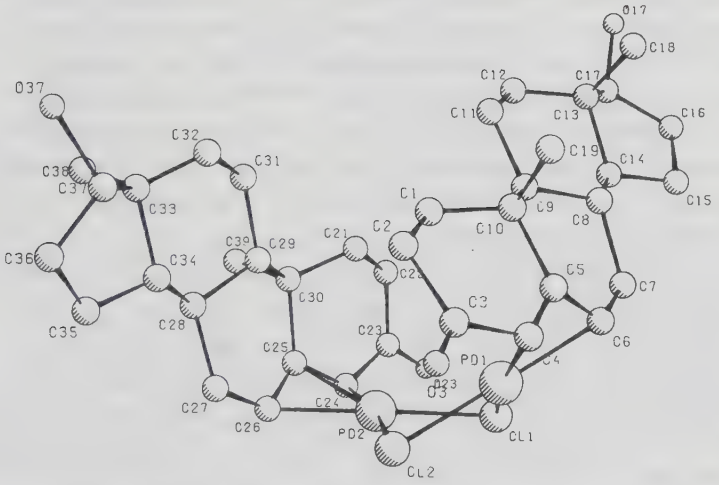


Abb. 31: Perspektivische Darstellung der Molekülstruktur des dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexes von Testosteron 8

Abb. 31 zeigt die Molekülstruktur des Testosteron-π-allyl-palladiumkomplexes 8. In diesem zuerst von Howsam und McQuillin[73] synthetisierten Trihaptokomplex sind die Palladiumatome axial α-ständig mit den Atomen C4, C5, C6 bzw. C24, C25, C26 verknüpft. Das steht im Einklang mit der kürzlich von Collins et al.[77] publizierten Struktur des monomeren Progesteron-π-allylpalladiumacetylacetonatkomplexes.

Die Pd-Cl und Pd-C-Bindungsabstände sind ähnlich wie in bisher bekannten π-Allylpalladiumchloridkomplexen[94]. Auffallend an dieser Struktur ist, daß das verbrückende Pd_2Cl_2-Strukturelement in 8 nicht wie erwartet quadratisch planar vorliegt, sondern entlang der C11-C12-Achse gewinkelt ist. Der Faltungswinkel beträgt 135.4(2)°. Der einzige bisher bekannte Komplex mit gewinkelter Pd_2-Cl_2-Brücke ist das dimere π-1,3-Dimethylallylpalladiumchlorid mit einem entsprechenden Faltungswinkel von 150° [95]. Wahrscheinlich sind folgende Packungseffekte für die Abwinkelung beim Testosteronkomplex verantwortlich: An die Pd_2-Cl_2-Einheit sind zwei Steroidliganden koordiniert, die aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen sehr leicht das "Cl1-Cl2-Scharnier" bewegen können. Insbesondere dürften die Wasserstoffbrückenbindungen am "langen Hebel" O17 bzw. O37 den größten Anteil an dieser Scharnierbewegung haben (s.u.). Die beiden koordinierten Steroidgerüste sind voneinander symmetrieunabhängig, d.h. Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel können im Prinzip voneinander abweichen. Wie die in Tab. 18 und 19 aufgeführten Werte zeigen, sind die Bindungsabstände C10-C19 bzw. C30-C39 und die Torsionswinkel C11-C12-C13-C18 bzw. C31-C32-C33-C38 statistisch signifikant verschieden. Besonders auffallend sind die Bindungsabstände C12-C13 bzw. C32-C33 mit 1.52(1) bzw. 1.58(1) Å. Vergleicht man die Strukturdaten der beiden Steroidgerüste in diesem Molekül mit den beiden kristallographisch verschiedenen Testosteronkonformeren T1 und T2[96], dann ergeben sich, wie erwarten, die größten Unterschiede bei den an der Komplexbildung beteiligten Atomen. Während der Bindungsabstand der Doppelbindung C4-C5 bei den Testosteronkonformeren T1 bzw. T2 1.346(5) bzw. 1.345(4) Å und der Abstand der Einfachbindung C5-C6 1.505(5) bzw. 1.495(4) Å beträgt, haben sich diese Abstände durch Wasserstoffabstraktion an C6 und Komplexbildung zu 1.42(1) Å für C4-C5 und 1.40(1) für C5-C6 bei K1 angeglichen; bei K2 betragen

die entsprechenden Werte 1.42(1) und 1.41(1) Å. Die anderen Bindungslängen im Steroidgerüst werden durch die Komplexbildung nicht mehr signifikant beeinflußt.

Am deutlichsten werden Konformationsunterschiede in den einzelnen Ringen des Steroidgerüsts aus den Torsionswinkeln und den daraus berechneten Asymmetrieparametern ersichtlich[97]. Die Definition der Asymmetrieparameter wird bei der Diskussion der Röntgenstrukturanalyse von 17A beschrieben (s.u.). In Tab. 20 werden die Torsionswinkel der beiden Testosteronkonformeren T1 und T2 denen der beiden Steroidliganden K1 und K2 gegenübergestellt.

Die Torsionswinkel von K1 und K2 unterscheiden sich um maximal 6°. Diese Unterschiede sind signifikant und müssen auf die unterschiedlichen intermolekularen Wechselwirkungen, die auf die Teilstrukturen K1 und K2 wirken, zurückgeführt werden. Die "Endpunkte" der Steroidreste, die Sauerstoffatome O3 und O17 sowie O23 und O37 sind nämlich in verschiedenen Wasserstoffbrückensysteme eingebunden.

Der Testosteron A-Ring weist vor allem in der Struktur T2 eine deutlich ausgeprägte 1α-Sofakonformation auf. Durch die Beteiligung der Atome C4, C5, C6 an der Komplexierung wird die Spiegelsymmetrie der 1α-Sofakonformation gestört ($\Delta C_s(1)$:14.6 und 9.1°); als Folge davon wird die A-Ringkonformation in Richtung einer 1α, 10β-Halbsesselkonformation verschoben ($\Delta C_2(1,10)$: 9.5 und 16.1°) (siehe Tab. 21 und die stereoskopische Abb. 32). Bei idealer 1α-Sofakonformation ist $\Delta C_s(1) = 0°$; bei idealer 1α,10β-Halbsesselkonformation ist $\Delta C_2(1,10) = 0°$.

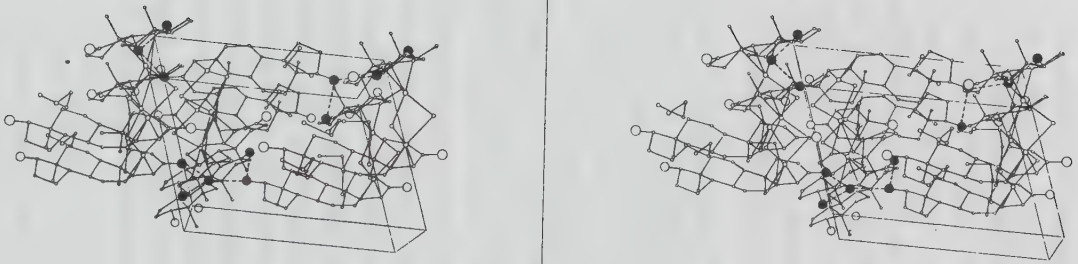


Abb. 32: Stereoskopische Darstellung der Kristallpackung des Komplexes 8. b-Achse zum Betrachter; a-Achse vertikal; c-Achse horizontal. O-Atome vergrößert gezeichnet (Betonung der H-Brücken); typische H-Brücken durch Schwärzung der O-Atome und gestrichelte Linien hervorgehoben

Tab. 21: A-Ring-Asymmetrieparameter [°] von Testosteron T1 und T2 und den Teilstrukturen K1 und K2 von 8

	$\Delta C_S(1)$	$\Delta C_2(1,2)$	$\Delta C_2(1,10)$
Testo T1	10.0	14.4	
Testo T2	7.9	18.3	
8 K1	14.6	40.4	9.5
8 K2	9.1	35.1	16.1

Wie aus der stereoskopischen Abb. 32 weiter ersichtlich ist, hat sich die ursprüngliche Sesselform des B-Ringes der Testosteronstrukturen deutlich zu einer 8β, 9α-Halbsesselkonformation verschoben: Beim B-Ring von K1 ist ΔC_2 (8,9) = 1.6°; für K2 beträgt ΔC_2 (8,9) = 11.7°. Die abgeflachte Form der B-Ringe von K1 und K2 zeigt sich auch an den Wellungsparametern ϕ_B (puckering parameters)[98] (siehe Tab. 22). Sie stellen den Mittelwert der Beträge der Torsionswinkel im B-Ring dar. Während bei Testosteron T2 ϕ_B = 52.2° beträgt, sind die ϕ_B-Werte für K1 bzw. K2 30.8 bzw. 30.4°.

Tab. 22: Wellungsparameter ϕ für die A-, B-, C- und D-Ringe der Testosteronkonformeren T1 und T2 und die der Steroidteilstrukturen K1 und K2 von 8

	ϕ_A	ϕ_B	ϕ_C	ϕ_D
Testo T1	27.3	52.1	54.9	29.8
Testo T2	25.7	51.2	56.2	29.7
8 K1	25.0	30.8	53.2	28.2
8 K2	27.8	30.4	53.8	30.3

In 4-En-3-ketosteroiden ist die 4-En-3-ketogruppe oft nicht ganz eben. Die O3-C3-C4-C5-Atome weichen im Mittel 0.03 bis 0.04 Å von der Ausgleichsebene ab. Bei Testosteron T1 mit einem O3-C3-C4-C5-Torsionsvinkel von 179.1° ist diese Gruppe nahezu planar; bei Testosteron T2 beträgt dieser Winkel -176.6°. Die 4 Atome der En-on-Gruppe weichen signifikant um ± 0.016 Å von der Ebene ab. Die Komplexbildung an C4 und C5 führt zu einer Verringerung der sp^2-Hybridisierung und damit zu einer Abnahme der Planarität.

Legt man die zur Beschreibung der Gesamtkonformation übliche Ebene der kleinsten Fehlerquadrate durch die Atome C5 bis C17 bzw. C25 bis C37, so sieht man, daß die A-Ring-Atome nur geringfügig von dieser Ebene abweichen (siehe Tab. 23). Der Komplex hat also eine flache Gesamtkonformation. Besonders der O3- bzw. O23-Abstand von dieser Ebene, der bei Steroiden im allgemeinen zwischen 1 Å (β-seitig) und 5 Å (α-seitig) oberhalb und unterhalb dieser Ebene liegt, weicht nur wenig von der Ebene ab.

Die Konformationen der C- und D-Ringe weichen erwartungsgemäß nur geringfügig von denen des Testosterons ab. Die C-Ringe nehmen bei den Komplexstrukturen K1 und K2 eine etwas stärker verdrillte Sesselkonformation ein als bei den Testosteronkonformeren T1 und T2, wie aus Tab. 24 mit den C-Ring-Asymmetrieparametern ersichtlich ist.

Tab. 24: C-Ring-Asymmetrieparameter [°] von Testosteron T1 und T2 und den Teilstrukturen K1 und K2 von 8

		$\Delta C_s(11)$	$\Delta C_2(8,9)$
Testo	T1	5.1	7.9
Testo	T2	2.5	7.3
8	K1	9.8	13.1
8	K2	9.1	6.4

Die D-Ringe liegen als verdrillte 13β-Briefumschlagkonformation vor. In Tab. 25 sind die nach Altona et al.[99] aus den Torsionswinkeln berechneten Δ - und ϕ_m-Werte aufgeführt.

Tab. 25: Vergleich der Pseudorotationsphasenwinkel Δ[°] und der maximal möglichen Torsionswinkel ϕ_m[°] bei den Testosteronkonformeren T1 und T2 und den Steroidteilmolekülen K1 und K2 von 8

	Δ	ϕ_m
14α-Briefumschlag	-36	
13β,14α-Halbsessel	0	
13β-Briefumschlag	36	
Testo T1	20.1	46.7
Testo T2	9.8	46.0
8 K1	22.4	44.2
8 K2	25.4	48.0

Die Δ-Werte zeigen für sämtliche Testosteronfünfringe Konformationen zwischen 13β,14α-Halbsessel und 13β-Briefumschlag, unabhängig vom Kristallaufbau. Bezogen auf das Δ/ϕ_m-Diagramm von Duax und Mitarbeitern[97], abgeleitet aus 165 Steroidfünfringen, fallen auch die Wertepaare des Testosteronkomplexes in den Bereich der größten Häufigkeit. Offensichtlich sind daher auch anisotrope Packungskräfte, wie unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungssysteme, nicht ausreichend, die Minimumenergie der D-Ringe in den Komplexstrukturen K1 und K2 entscheidend zu verändern.

Tab. 23: Abweichungen der 17 Kohlenstoffatome (in Å) des Steroidskeletts von den least-squares-Ebenen durch die Atome C5-C17 (Ebene 1) bzw. C25-C37 (Ebene 2); + = β-seitig, - = α-seitig

Ebene 1		Ebene 2	
O3	-0.1121	O23	-0.4014
C1	0.4218	C21	-0.4022
C2	0.0702	C22	-0.1387
C3	-0.0201	C23	-0.2597
C4	-0.0310	C24	-0.2201
C5*	-0.1452	C25*	0.0357
C6*	0.1870	C26*	-0.2638
C7*	0.3115	C27*	-0.2439
C8*	-0.2432	C28*	0.3012
C9*	0.2328	C29*	-0.1855
C10*	-0.3275	C30*	0.3471
C11*	-0.0233	C32*	-0.3478
C12*	0.3222	C33*	0.3274
C13*	-0.3294	C34*	-0.1069
C14*	0.1753	C35*	0.2550
C15*	-0.1871	C36*	0.0761
C17*	0.1427	C37*	-0.2727

Winkel zwischen den Flächennormalen: 42.6°

Die mit * gekennzeichneten Atome definieren die least-squares-Ebenen 1 und 2 mit den Gleichungen (x,y,z sind Zellkoordinaten):

11.4744 x - 2.0910 y - 6.6477 z = 1.4430 Ebene 1

7.9245 x - 9.2499 y - 0.7174 z = 3.9989 Ebene 2

Man kann den Komplex 8 als Hydrat betrachten, das in ein starren Netzwerk von Wasserstoffbrücken eingebunden ist und dessen Hohlräume mit locker gebundenen 1,2-Dichlorethanmolekülen ausgefüllt sind. Aus der stereoskopischen Abb. 32 sind Kristallpackung und Wasserstoffbrückenbindungen ersichtlich.

Die Moleküle von 8 sind in Form einer rechtsdrehenden Helix entlang der zweizähligen Schraubenachse (parallel der b-Achse, durch x = 1/2 und z = 1/2) miteinander verknüpft. Die Wassermoleküle befinden sich zwischen den in y-Richtung übereinanderliegenden Steroidresten K1 (C1-C19) und verbinden sowohl die Moleküle zu Helices, als auch die Helixstränge untereinander parallel zur bc-Ebene. Eine schematische Darstellung der Brückenbindungsabstände und der Symmetriebeziehungen gibt Abb. 33.

Demzufolge besteht ein Einkristall aus Schichten (Dicke = a = 11.69 Å) von wasserstoffbrückenverknüpften gleichgerichteten Helices, wobei die Schichten parallel (100) verlaufen und durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden.

Bei stereoskopischer Betrachtung von Abb. 32 wird die oben schon erwähnte Abwinkelung der Pd_2Cl_2-Brücke zwischen den beiden Steroidteilen ersichtlich: Die Einbindung der einzelnen Steroidteilmoleküle in untereinander verbundene Helices führt zu der beobachteten Winkelung entlang Cl1-Cl2-Achse. In Lösung könnte sich durchaus eine planare Pd_2Cl_2-Brücke ausbilden.

In den Hohlräumen der einzelnen Helices befinden sich vier 1,2-Dichlorethanmoleküle, die alle in der gauche-Konformation vorliegen. Da beim 1,2-Dichlorethan die gauche- und die anti-Konformation etwa gleiche Energie haben[100], dürfte die Bevorzugung beider gauche-Formen mit einer günstigeren Packung zu erklären sein.

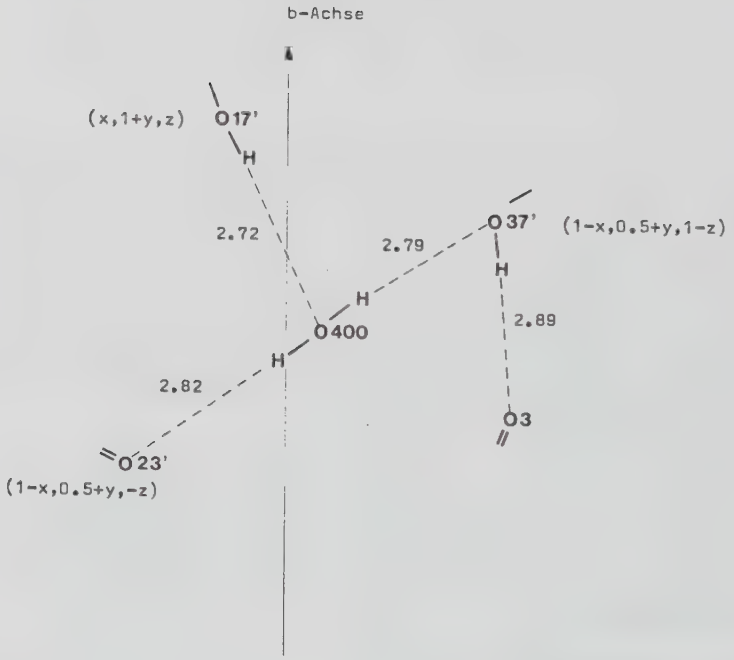


Abb. 33: Schema der H-Brücken (Blickrichtung a-Achse) mit Symmetricode der O-Atome. Abstände (in Å) beziehen sich auf O-Atome

2. Die Synthese des 6β-Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivates von Testosteron 17A und des 6β-Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivats von Progesteron 19/1 und analoger Derivate

2.1. Allgemeine Bedingungen für die allylische Alkylierung von π-Allylpalladiumchloridkomplexen

Das Gebiet der allylischen Alkylierung über π-Allylpalladium-(2^+)-chloridkomplexe als stöchiometrische Zwischenprodukte oder mittels katalytischer Palladium-(O)-komplexe ist vor allem in den Arbeitsgruppen von Trost in den USA, von Tsuji in Japan und in der australischen Gruppe von Jackson, Strauss, Collins und Timms ausführlich bearbeitet und in vielen Originalarbeiten und Übersichtsartikeln dargestellt worden. Es sind hier nur einige wichtige zitiert[22,74,76,101-106]. Im folgenden wird nur über die zuerst genannte Möglichkeit der Synthese stöchiometrischer π-Allylpalladiumchloridkomplexe zur allylischen Aktivierung von Olefinen berichtet. Diese Komplexe sind im Gegensatz zu anderen metallorganischen Komplexen elektrophile Reagentien. Durch die Komplexbildung werden das ursprünglich vinylische und das ursprünglich allylische C-Atom zu prinzipiell gleichwertigen Angriffspunkten eines nukleophilen Reagenzes. Substitution am ursprünglich allylischen C-Atom führt zur Rückbildung der Doppelbindung an ihrer ursprünglichen Stelle; Substitution am ursprünglich vinylischen C-Atom führt zu Allylumlagerung mit Wanderung der Doppelbindung.

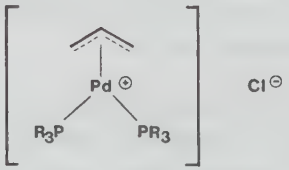
Das Zustandekommen der allylischen Alkylierung der π-Allylpalladiumhalogenkomplexe, sowie die Regio- und Stereoselektivität der gebildeten Produkte wird hauptsächlich von drei Faktoren bestimmt:

von der Elektrophilie und Stereochemie des π-Allylpalladiumkomplexes

von dem zum Reaktionsansatz zugegebenen aktivierenden Liganden

von der Nukleophilie und Stereochemie des Alkylierungsreagenzes

Je größer die Elektrophilie des Komplexes desto leichter erfolgt die Alkylierung. Wenn schon elektronenziehende Gruppen auf das Allylsystem wirken, wie z.B. die Ketogruppe in 4-En-3-ketosteroiden ist nur ein Minimum an Aktivierung am Palladiumatom durch Liganden erforderlich. Bei der Aktivierung durch Liganden wird die Elektrophilie des Komplexes erhöht. So werden die Palladiumchloridkomplexe der 4-En-3-ketosteroide schon in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel bei Raumtemperatur alkyliert. DMSO wirkt selbst als Ligand und ionisiert dimere π-Allylpalladiumchloridkomplexe. Die Alkylierung in THF ohne Zusatz von Liganden gelingt auch hier nicht. Als Liganden finden allgemein Phosphine und Phosphite, wie Triphenylphosphin, 1,2-Bis(diphenylphosphin)ethan, Hexamethylphosphorigsäuretriamid u.a. Verwendung. Das optimale Verhältnis von aktivierendem Phosphinliganden von zwei Phosphoratomen zu einem Palladiumatom spricht für die Bildung von kationischen Komplexen folgender Art:



Die Art des Liganden bestimmt die Regioselektivität der Alkylierung. Der genaue Zusammenhang zwischen der Struktur des Liganden und der Regioselektivität ist noch unklar. Es ist kein Zusammenhang mit der Fähigkeit des Liganden σ-Donor und π-Akzeptorkomplexe zu bilden herzustellen. Die Regioselektivität wird auch die räumliche Größe des Liganden beeinflußt. Der andere Faktor der neben der Art des π-Allylpalladiumkomplexes die Regioselektivität bestimmt, ist die Nukleophile des Alkylierungsreagenzes. Ob die Alkylierung überhaupt abläuft,hängt von der Art des Nukleophils ab. Sogenannte harte Basen, wie Methyllithium,Methylmagnesiumjodid und schwefelstabilisierte Anionen, wie z.B. 2-Lithiumdithian ergeben keine Alkylierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, den Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex mit dem Dianion von 3-Mercaptopropionsäure zu alkylieren, aber ebenfalls mit negativem Ergebnis. Es entsteht ein orangeroter Komplex, d.h. das Sulfhydrilanion greift wahrscheinlich am Palladium an und wirkt dort als Ligand. Bei weichen Anionen, das sind i.a. CH-acide Verbindungen, die mindestens eine Estergruppe haben, hängt die Alkylierungsaktivität vom pk_a-Wert der zugehörigen Carbonsäure ab: je stärker die Säure, desto leichter verläuft die Alkylierung. So ist das Anion von Phenylmercaptoessigsäuremethylester ein alkylierendes Agens, im Gegensatz zu Methylmercaptoessigsäuremethylester. Ersteres ist durch den -I-Effekt des Phenylrestes wesentlich nukleophiler als Letzteres. Bei der Untersuchung der Reaktivität von Methylsulfinyl-, Methylsulfenyl- und Methylsulfonylessigsäuremethylester zeigt sich, daß mit Triphenylphosphin als Ligand nur der zuletzt genannte Ester als Alkylierungsreagenz wirkt. Verwendet man aber 1,2-Bis(diphenylphosphin)ethan ist auch noch mit dem Methylsulfenylester eine Alkylierung möglich; während der zuerst genannte Ester unter diesen Bedingungen nicht alkyliert.

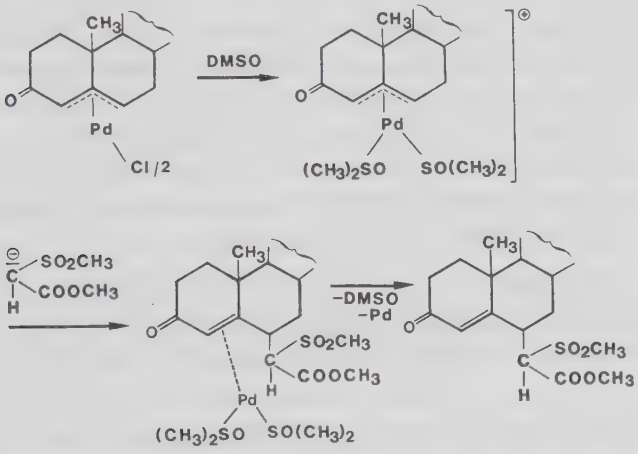
2.2. Der Reaktionsmechanismus der allylischen Alkylierung

Der Reaktionsmechanismus muß erklären, ob das Nukleophil zuerst am Palladium in einer reversiblen Reaktion oder gleich an einem der beiden infrage kommenden Kohlenstoffatome angreift. Trost und Mitarb. diskutieren die beiden Möglichkeiten auf folgende Weise: bei der ersten Möglichkeit greift das nukleophile Agens das hochpolarisierbare weiche Anion einer CH-aciden Verbindung in einer kinetischen Reaktion zunächst am Palladiumatom des kationischen Komplexes an. In einer reversiblen Reaktion erfolgt dann eine intramolekulare Wanderung des Nukleophils vom Palladium zum Kohlenstoff bzw. die Dissoziation vom Palladium gefolgt von einem erneuten Angriff am C-Atom. Je geringer die Stabilität des Anions, desto weniger reversibel wird die Reaktion sein. Bei der zweiten Möglichkeit reagiert das weiche nukleophile Agens bevorzugt mit dem C-Atom anstatt mit dem Palladium in einer kinetischen Reaktion. Je stabiler das Anion desto größere Bedeutung hat die thermodynamische Stabilität des Anfangproduktes. Die Bildung einer C-C-σ-Bindung und einer Olefin-Palladium-π-Bindung auf Kosten der π-Allylpalladium-Bindung ist exothermer als die Bildung einer C-Palladium-σ-Bindung. Härtere nukleophile Agentien würden das stärker positiv geladene Palladium angreifen. Die Reaktion wäre dann reversibel.

Für beide Möglichkeiten sind experimentelle Hinweise vorhanden. Die prinzipielle Wirkungsweise von Liganden spricht für die zweite Möglichkeit: ein idealer Ligand ist ein guter σ-Donor und setzt damit die Angriffsmöglichkeit des Nukleophils am Palladium herab; er ist gleichzeitig ein guter π-Akzeptor, der die Elektronendichte delokalisiert und damit einen nukleophilen Angriff am C-Atom erleichtert.

Jackson und Strauss[107)] nehmen für DMSO als Ligand einen Mechanismus an, bei dem zunächst der π-Komplex in einen

monomeren σ-Komplex mit einem am allylischen C-Atom lokali-Pd-Cl-DMSO-Rest übergeht. Mit einem weiteren Mol DMSO bildet sich ein kationischer σ-Komplex. Das steht im Gegensatz zum oben beschriebenen kationischen π-Allylkomplex. Analog einer S_N2-Reaktion wird dann das allylische C-Atom von einem Nukleophil angegriffen, während gleichzeitig der $Pd(DMSO)_2$-Rest abdissoziiert. Dieser Mechanismus soll die Regiospezifität der Reaktion erklären. Er macht aber gleichzeitig auch die Stereospezifität, d.h. die Inversion des Substituenten deutlich.



2.3. Die Reaktionsbedingungen für die allylische Alkylierung der π-Allylpalladiumchloridkomplexe von Testosteron 8 und von Progesteron 9 mit CH-aciden Estern

Ausgehend von den Arbeiten von Collins, Jackson und Timms[14,15] in denen die Synthese der 6β-Malonesterderivate von Testosteron und Progesteron beschrieben wird, werden in dieser Arbeit die π-Allylpalladiumchloridkomplexe von Testosteron und Progesteron mit verschiedenen CH-aciden Estern, die nur

eine Estergruppe haben, zur Reaktion gebracht, um so bei beiden 4-En-3-ketosteroiden in Position 6 letztlich eine Carboxylfunktion einzuführen.

Vor allem wegen der vorteilhafteren spektroskopischen Eigenschaften werden prinzipiell nur Methylester zur Alkylierung eingesetzt. Das Estermethylsignal zeigt in ^{1}H-NMR-Spektrum ein scharfes Singulett bei etwa 3.7 ppm, das für drei Protonen integriert und damit eine hohe Intensität hat. Esterreste mit zusätzlichen CH_2-Gruppen würden die Auswertung von ^{13}C-NMR-Spektren erschweren, da die Signale der vielen alicyclischen CH_2-Gruppen eines Steroidmoleküls im mittleren Hochfeldbereich ohnehin schlecht getrennt sind. Außerdem könnten sich mit sperrigen Esterresten Schwierigkeiten bei der Hydrolyse oder anderen Reaktionen durch sterische Hinderung ergeben. Verseift man Methylester können die entstehenden Carbonsäuren leicht mit Diazomethan in die Methylester zurückverwandelt werden. Das ist zur Identifizierung von Zwischenprodukten oft von Vorteil (s.u.).

Folgende CH-acide Methylester werden zur allylischen Alkylierung eingesetzt: Cyanessigsäuremethylester, Malonsäuredimethylester, Phenylsulfonylessigsäuremethylester und Methylsulfonylessigsäuremethylester. Die beiden zuletzt genannten Ester sind im Handel nicht erhältlich; über ihre Synthese wird unten berichtet.

Zunächst werden nur Vorversuche mit 0.05 oder 0.1 mMol Testosteron- bzw. Progesteronkomplex und einer äquimolaren Menge des CH-aciden Esters durchgeführt und das Ergebnis dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Da i.a. dimere Komplexe eingesetzt werden, muß formal die doppelte Menge des CH-aciden Esters eingesetzt werden, um äquimolare Bedingungen zu erreichen. Das Arbeiten mit zwei Äquivalenten bietet keinen Vorteil bei der Ausbeute des Alkylierungsproduktes. Wie oben erläutert, läuft die allylische

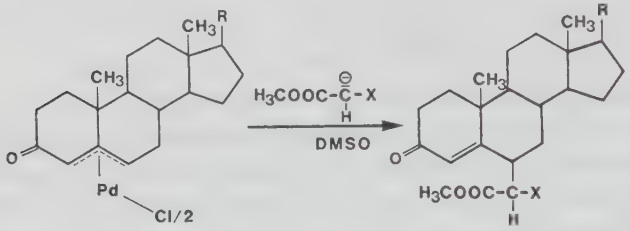
Alkylierung nur in Anwesenheit eines Liganden ab. Die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel, das auch die Eigenschaft eines Liganden hat, ist der Verwendung von THF mit Zusatz von Triphenylphosphin deutlich überlegen. Letzteres muß bei der Aufarbeitung vom Produkt abgetrennt werden. Setzt man die monomeren π-Allylpalladiumhalogentriphenylphosphin bzw. -pyridinkomplexe ein, läuft die Reaktion genau wie mit dem dimeren Komplexen ab. Als Base für die Bildung des Anions aus den CH-aciden Estern wird ausschließlich Natriumhydrid verwendet.

Zur Durchführung der Reaktion wird der CH-acide Ester in DMSO gelöst und die äquimolare Menge Natriumhydrid, nach Entfernen des Paraffins durch Waschen mit n-Pentan, zugegeben. Wenn sich das Natriumsalz des CH-aciden Esters unter Wasserstoffentwicklung gebildet hat, wird die Lösung des π-Allylpalladiumhalogenkomplexes in DMSO, d.h. also der π-Allylpalladium-DMSO-Komplex, zur Lösung zugegeben. Das Eintreten der Reaktion kann schon nach wenigen Minuten Reaktionsdauer am Auftreten einer allmählich zunehmenden Schwarzfärbung, die vom ausgefallenen metallischen Palladium herrührt, erkannt werden. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt.

Größere Ansätze werden im 1 mMol- und 10 mMol-Maßstab durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgt nach 48 Stunden durch Zugabe von Eis/Wasser und Extraktion des Alkylierungsproduktes mit Ethylacetat und anschließender Kristallisation bzw. Chromatographie.

Bei kleineren Ansätzen wird die präparative Schichtchromatographie, bei größeren Ansätzen die Chromatographie an Trockensäulen oder Fertigsäulen verwendet. In allen Fällen dient Kieselgel als Adsorbens. Vor allem die Mitteldruckflüssigkeitschromatographie an zwei hintereinander geschalteten Kieselgelfertigsäulen hat sich zur Auftrennung von Diastereo-

merengemischen bewährt. Die Technik der Durchführung wird im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben. In der folgenden Abbildung sind die synthetisierten Methylester dargestellt. Ihre chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Von einem Derivat (17/A) wird die Röntgenstrukturanalyse diskutiert.



8 R = OH

9 R = $COCH_3$

15/1+2 R = $COCH_3$; X = CN

16/1+2 R = OH; X = CN

17A; 17B R = OH; X = $SO_2C_6H_5$

18/1; 18/2 R = OH; X = SO_2CH_3

19/1; 19/2 R = $COCH_3$; X = SO_2CH_3

20 R = OH; X = $COOCH_3$

21 R = $COCH_3$; X = $COOCH_3$

2.4. Testosteron-6β-yl-cyanessigsäuremethylester 16 und Progesteron-6β-yl-cyanessigsäuremethylester 15

Die 6β-Cyanessigsäuremethylesterderivate von Testosteron 16 und Progesteron 15 erscheinen nach Aufarbeitung, anschliessender Trockensäulenchromatographie im System Diethylether und daran anschließender präparativer Schichtchromatographie im selben System, in der analytischen Dünnschichtchromatographie im System Chloroform : Ethylacetat = 1:1

einheitlich. In den ^{1}H-NMR-Spektren sind jedoch jeweils zwei Methylestersignale im Verhältnis 1:1 zu beobachten. Die Differenz dieser Signale beträgt nur 0.10 ppm. Die Untersuchung in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit einer Umkehrphasensäule (RP 18) zeigt, daß ein Gemisch von drei Komponenten vorliegt. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um zwei diastereomere Ester, ähnlich wie sie unten bei 17A/17B beschrieben werden, und um Dehydrotestosteron bzw. Dehydroprogesteron. Wegen der geringen Unterschiede in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Diastereomeren wird eine präparative Trennung nur wenig Aussicht auf Erfolg haben.

2.5. Testosteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 20 und Progesteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 21

Die schon aus der Literatur[14,15] bekannten 6β-Malonsäuredimethylesterderivate von Testosteron 20 und Progesteron 21 lassen sich nach Chromatographie an Trockensäulen oder Fertigsäulen leicht in kristalliner Form erhalten. In den Reaktionsansätzen sind keine isomeren Nebenprodukte vorhanden.

Da die beiden Methylestergruppen im Steroidmolekül eine unterschiedliche sterische Umgebung haben, sind sie diastereotop [108]. Diastereotope Gruppen sich chemisch nicht äquivalent und führen i.a. zu anisochronen Kernresonanz-Absorptionen[109]. Es treten daher zwei verschiedene Methylestersignale im ^{1}H-NMR- und zwei verschiedene Carbonyl- und Estermethyl-C-Signale im ^{13}C-NMR-Spektrum auf. Die Differenz der Estersignale im ^{1}H-NMR-Spektrum beträgt 0.10 ppm oder 10.0 Hz. Wie bei der Diskussion von 17A und 17B dargelegt wird, ist die Zuordnung von C5 und den Estercarbonylsignalen im ^{13}C-NMR-Spektrum nicht eindeutig. Andererseits sind die Differenzen zwischen den drei Werten ziemlich gering. Da aber bei den Estercarbonylsignalen analog

zu 17A und 17B (s.u.) eine Tieffeldverschiebung gegenüber Malonsäuredimethylester zu erwarten ist, werden die beiden höheren Werte den Estercarbonyl-C-Atomen zugeordnet.

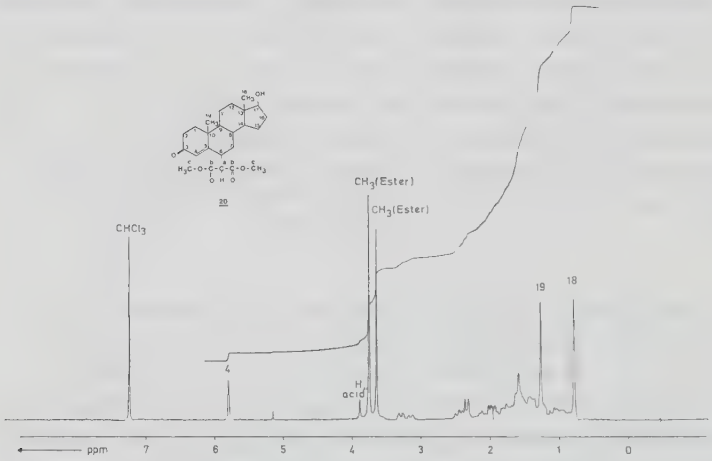


Abb. 34: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) von Testosteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 20 in $CDCl_3$

Für C5 bleibt dann der kleinste der drei Werte übrig. Analog zu 17A und 17B gehört bei 20 zum tieffeldverschobenen Ester-H-Signal bei 3.74 ppm das schwach tieffeldverschobene C=O-Signal von 167.4 (+0.67) ppm; zum nicht verschobenen Ester-H-Signal bei 3.63 gehört dann das stärker tieffeldverschobene C=O-Signal bei 167.9 (+1.2) ppm. In Abb. 35 ist das protonenbreitbandentkoppelte Spektrum von 21, in Abb. 36 das ^{13}C-NMR-Spektrum von 20 nach der Spin-Echo-Methode abgebildet. Vor allem C8 läßt sich eindeutig mit dieser Methode zuordnen.

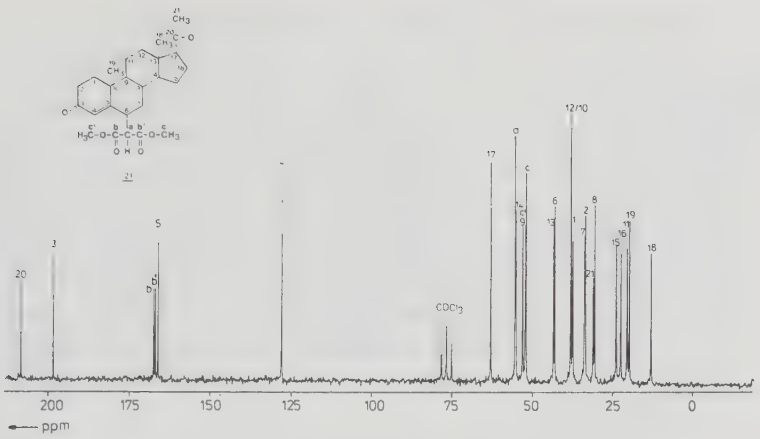


Abb. 35: ^{13}C-NMR-Spektrum (protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz) von Progesteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 21; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$

Die FD-MS-Spektren zeigen nur die Molekül-Peaks mit den Masseneinheiten 418 bzw. 444. In den Massenspektren sind jeweils die Fragmente M^+-131; entsprechend M^+-$CH(COOCH_3)_2$ und M^+-59, entsprechend M^+-$COOCH_3$, vorhanden.

Die Unterschiede im Schmelzpunkt (Δ = 18°C), Drehwert (Δ = 41.7°) und ^{13}C-Wert für ein Estercarbonyl-C-Atom (Δ = 10.9 ppm) zeigen, daß 20 nicht identisch ist mit dem von Collins et al.[15] synthetisierten Produkt.

2.6. Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A und des Stereoisomere 17B

Die Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivate von Testosteron 17A und 17B sind Diastereomere, die als Haupt- und Nebenprodukt bei der allylischen Alkylierung des Testosteronkomplexes 8 gebildet werden.

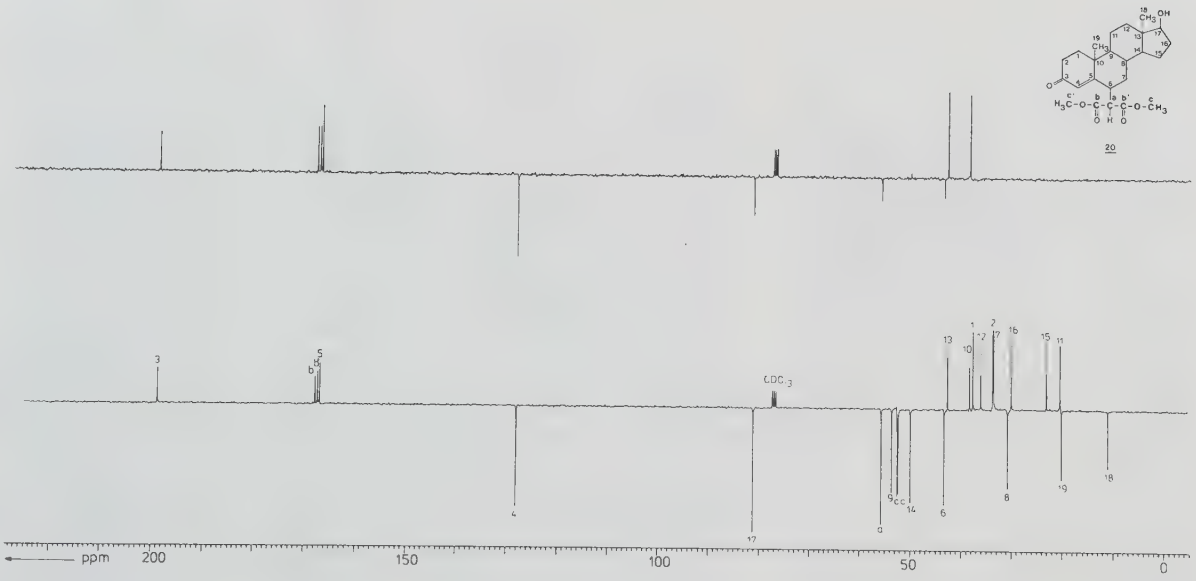


Abb. 36: ^{13}C-NMR-Spektrum (Spin Echo; 100 MHz) von Testosteron-6β-yl-malonsäure-dimethylester 20; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$.
Oben: Programm GASPE; positive Signale: quartäre C-Atome
Unten: Programm J-Mod; positive Signale: sekundäre und quartäre C-Atome;
negative Signale: primäre und tertiäre C-Atome

2.6.1. Die chromatographische Trennung der Stereoisomeren 17A und 17B

Die Diastereomeren wandern in der Dünnschichtchromatographie im System Hexan:Ethylacetat = 2:3 wegen des polaren Phenylsulfonylrestes nur sehr wenig und sind nur mäßig getrennt; die R_f-Werte betragen für 17A 0.16 und für 17B 0.12. Sie lassen sich in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf Kieselgelsäulen im selben Trennsystem verhältnismäßig gut trennen (siehe Abb. 37). Auf einer 25 cm langen Säule beträgt die Differenz der Retentionszeiten 0.8 min.

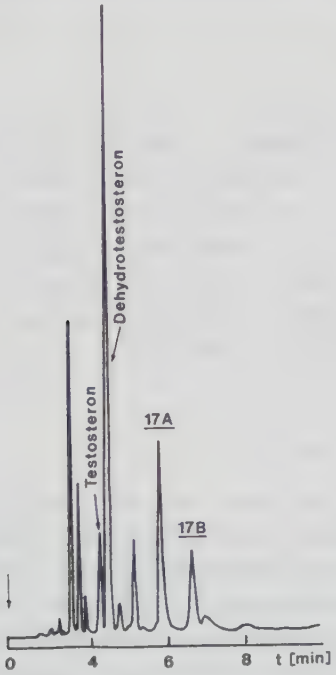


Abb. 37: HPLC-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Reaktionsansatzes zur Gewinnung der Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivate von Testosteron 17A und 17B. Bedingungen: Kieselgelsäule (25x0.4 cm; Nucleosil 50-5); Elutionsmittel: Hexan:Ethylacetat = 2:3; Druck: 120 bar (1740 psi); Durchflußrate: 2 ml/min; Detektion: 250 nm

Vor den beiden Isomeren werden, wie bei allen analogen Reaktionsansätzen, die identifizierten Nebenprodukte Testosteron und Dehydrotestosteron eluiert. Bei Chromatographie auf einer Umkehrphasensäule (RP 18) im System Methanol:H_2O: Propionsäure = 70:30:0.1 ist keine Auftrennung des Isomerengemisches zu beobachten.

Nach der Kristallisation von 17A wird daher aus der Mutterlauge 17B vom restlichen 17A durch präparative Mitteldruckflüssigkeitschromatographie an zwei hintereinandergeschalteten Kieselgelfertigsäulen im System Hexan:Ethylacetat = 2:3 abgetrennt. Die Trennung gelingt mit nur wenigen Überlappungsfraktionen.

Das Hauptprodukt 17A kristallisiert aus Ethylacetat bzw. Hexan-Ethylacetat. Die Kristalldaten und die Diskussion der Röntgenstrukturanalyse sind unten beschrieben. Die Kristalle von 17A zersetzen sich nach einiger Zeit bei Raumtemperatur zu einem braunen Teer. Das Nebenprodukt 17B kann trotz vieler Versuche noch nicht zur Kristallisation gebracht werden. Die amorphe Substanz ist auch nach monatelangem Aufbewahren bei Raumtemperatur beständig.

2.6.2. Die FD-Massenspektren

Aus den FD-Massenspektren (Abb. 38) und den Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektren ist ersichtlich, daß bei beiden Isomeren der Phenylsulfonylrest leicht abgespalten wird. So ist in einem von drei gemessenen FD-Spektren von 17A neben dem um den Phenylsulfonylrest verminderten Fragment (359) auch der Peak für den Phenylsulfonylrest selbst (141) vorhanden. Außerdem sind höhere Peaks als der Molmasse entspricht vorhanden: 616, 718, 993 und 994. Der Peak 616 könnte durch Anlagerung von 5 Natriumionen entstanden sein. Die anderen Peaks können auf diese Weise nicht erklärt werden.

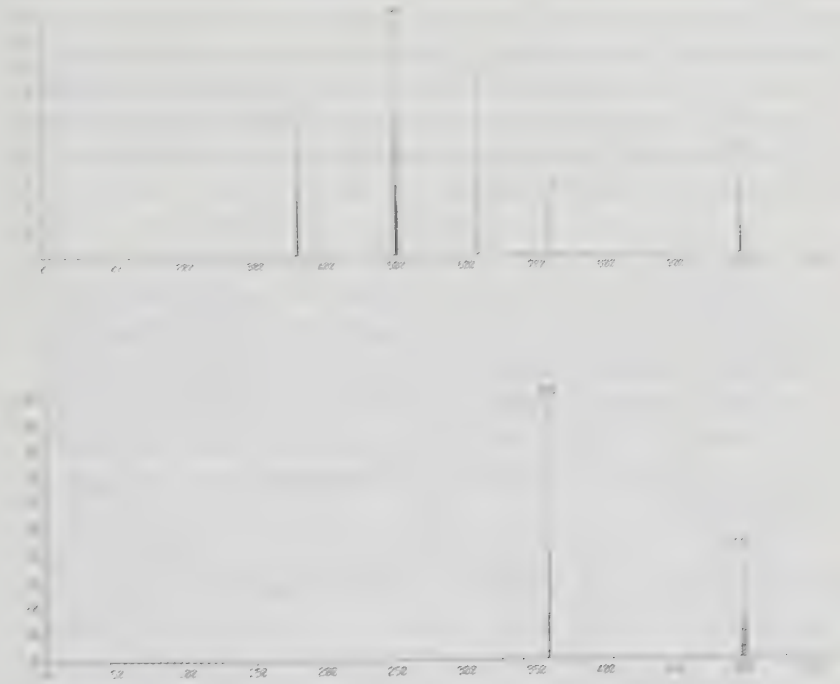


Abb. 38: Die FD-Massenspektren von 17A (oben) und 17B (unten); M = 500; Lösungsmittel: CH_2Cl_2; Ionenquelle-Temperatur: 65°C

Die Massenspektren von 17B zeigen sehr viele Peaks mit geringer Intensität im Gegensatz zum 17A Massenspektrum. Das könnte auf die amorphe oder mikrokristalline Modifikation von 17B zurückzuführen sein. Möglicherweise enthält 17B als Verunreinigung mehrere Komponenten mit geringer Konzentration, die in den anderen Spektren nicht nachgewiesen werden, die aber die Kristallisation von 17B behindern oder es liegt ein Gemisch mehrer polymorpher Modifikationen mit nur ganz geringen Unterschieden vor.

2.6.3. Die Drehwerte und die Konfiguration an C6 und C-a

Die Drehwerte der beiden Diastereomeren werden in Dioxan und Chloroform gemessen. Obwohl sich beide Lösungsmittel stark in der Polarität unterscheiden, findet man keine Lösungsmittelabhängigkeit der Drehwerte. Beachtlich ist, daß sich auch die Drehwerte der beiden Diastereomeren nur geringfügig unterscheiden.

Tab. 26: Spezifische Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ von 17A und 17B bei c = 1 in [°]

Lösungsmittel	17A	17B
Dioxan	+ 52.4	+ 54.4
Chloroform	+ 46.0	+ 54.6

Beide Diasteromere haben R-Konfiguration an C6, da bei beiden Isomeren der Substiuent β-ständig ist. 17A hat nach dem Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse S-Konfiguration am neu eingeführten Asymmetriezentrum C-a, dem ursprünglich CH-aciden C-Atom des Phenylsulfonylessigsäuremethylesters. Auf Grund der fast gleichen Drehwerte kommt man zu der Schlußfolgerung,

daß 17B ebenfalls S-Konfiguration an diesem C-Atom hat. Das würde bedeuten, daß 17B ein Konformationsisomeres von 17A ist. Die Unterschiede in chromatographischen und spektroskopischen Verhalten würden dann auf einer Torsionsdiastereoisomerie, d.h. auf einer Rotationsbehinderung um eine oder mehrere Bindungen im Substituenten oder wahrscheinlicher um die Bindung des Substituenten an das Steroidgerüst (C6 - C-a-Bindung) beruhen. Wahrscheinlich hängt das Auftreten von 17B mit dem Vorhandensein des Phenylrestes zusammen. Denn in entsprechenden Reaktionsansätzen zur Synthese von 18 und 19 bei denen der Phenyl- durch den Methylsulfonylessigsäuremethylester ersetzt ist, werden keine entsprechenden Nebenprodukte gefunden. Außerdem läßt sich nach vorläufigen dünnschichtchromatographischen Versuchen 17A durch längeres Stehenlassen in DMSO bei Raumtemperatur in 17B überführen.

Im anderen Fall hätte das andere der beiden möglichen CH-aciden Anionen reagiert, es wäre das Konfigurationsisomere mit R-Konfiguration an C-a entstanden. Es würde dann eine echte Diastereoisomerie, die an das Vorhandensein mehrerer asymmetrischer Zentren im Molekül gebunden ist, vorliegen. Die spektroskopische Untersuchung der beiden Isomeren soll nun weitere Hinweise auf eine dieser beiden Möglichkeiten geben.

2.6.4. Die CD-Spektren

Wie unten (2.10.) noch ausgeführt wird, zeigen die CD-Spektren der beiden Isomeren im n $\rightarrow \pi^*$-Bereich ein unterschiedliches Bild (Abb. 51). Während bei 17A der ganze Bereich einen positiven Cottoneffekt hat, und damit sein Vorzeichen gegenüber dem unsubstituierten Testosteron vollständig wechselt, zeigt der n $\rightarrow \pi^*$-Übergang von 17B einen langwelligen positiven und einen kurzwelligen negativen Cotton-

effekt. Nach Beecham und Collins[110] läßt ein Vorzeichenwechsel an dieser Stelle keine Aussage über die Stereochemie eines 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroids zu. Auf Grund des hier gefundenen Ergebnisses scheint es aber doch denkbar, daß eine andere Konformation oder Konfiguration des 6β-Substituenten des 4-En-3-ketosystem und damit die Konformation des A- und B-Ringes so beeinflußt, daß der Cotton-effekt in dieser Weise verändert wird.

2.6.5. Die IR-Spektren

In den IR-Spektren der beiden Isomeren sind keine großen Unterschiede festzustellen. Die wichtigsten IR-Daten sind in Tab. 27 zusammengestellt.

Tab. 27: Die wichtigsten Valenz- und Spreizdeformationsschwingungen in cm^{-1} aus den IR-Spektren von 17A und 17B

C-Atom	Bande	17A	17B
4-6	C=C	1605	1608
3	C=O	1675	1677
b	C=O	1738	1743
17	OH	3458	3450
		3550	
2	CH_2	--	1402

Insgesamt zeigt das Spektrum von 17A die intensiveren Banden. Der auffallendste Unterschied ist der Bereich der OH-Valenzschwingung. Beim kristallinen 17A tritt zusätzlich zu der breiten Bande bei 3458 cm^{-1}, die auf intermolekulare und schwache Wasserstoffbrückenbindungen hinweist[111], eine scharfe Bande bei 3550 cm^{-1} auf. Sie kommt entweder durch

intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen oder durch die freie OH-Valenzschwingung zustande. Erstere bilden sich bei der dichten Packung im Kristall wahrscheinlich eher aus als in einem amorphen Material, wie es bei 17B vorliegt; hier fehlt nämlich diese Bande. Die Bande bei 3458 bzw. 3450 cm^{-1} bei 17A bzw. 17B kann auch durch H_2O-Spuren in den KBr-Pillen verursacht sein. Vergleiche mit anderen IR-Spektren von OH-gruppenfreien Substanzen zeigen, daß dann die Intensität dieser Bande aber wesentlich geringer ist.

Im Bereich der C=C- und C=O-Valenzschwingung lassen sich nur sehr geringe Unterschiede bei beiden Isomeren feststellen. Im Fingerprintbereich ist bei 17B eine zusätzliche Bande bei 1402 cm^{-1} vorhanden. Bei dieser Bande handelt es sich möglicherweise um eine Spreizdeformationsschwingung (bending vibration) der C2-Methylengruppe, die zwischen 1400 und 1470 cm^{-1} erscheint. In der Literatur ist eine solche für 6β-Bromtestosteronacetat beschrieben[112].

Die genannten Unterschiede im Valenz- und Deformationsschwingungsbereich der in festem Zustand (KBr) aufgenommenen IR-Spektren können durch einen Polymorphismus bedingt sein. Dieser kann durch unterschiedliche Kristallpackungskräfte, die verschiedene intermolekulare Wechselwirkungen zur Folge haben, zustande kommen. Auch Unterschiede in der intramolekularen Geometrie, wie z.B. die oben diskutierte unterschiedliche Anordnung des Substituenten kommen infrage.

Zur Klärung dieses Problems werden die ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektren, die ja in Lösung aufgenommen werden, untersucht.

2.6.6. Die ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektren

Am auffallendsten in den ^1H-NMR-Spektren der Isomeren ist die Differenz der beiden Estermethylsinguletts. Bei 17A erscheint dieses Signal bei 3.35, bei 17B bei 3.58 ppm; im

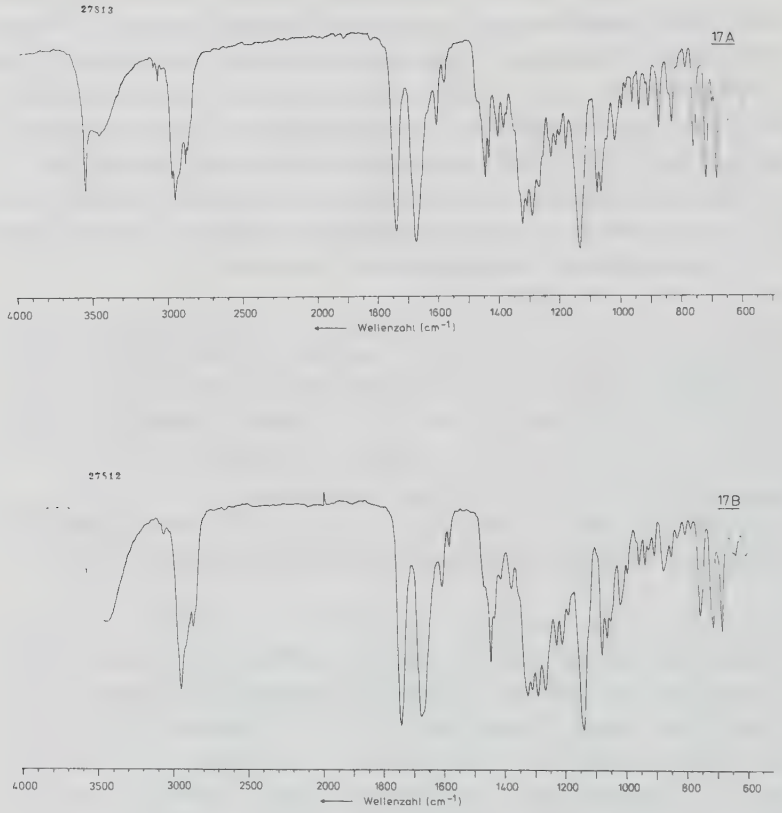


Abb. 39: Die IR-Spektren von 17A und 17B, aufgenommen in KBr.

Vergleich dazu hat es beim Phenylsulfonylessigsäuremethylester den Wert 3.68 ppm. Das 17A-Signal erfährt damit gegenüber den 17B-Signal eine Hochfeldverschiebung von -0.23 ppm, gegenüber der CH-aciden Ausgangsverbindung sogar um -0.33 ppm.

Da sich die Estercarbonylsignale im ^{13}C-NMR-Spektrum bei den untersuchten Verbindungen nicht von den C5-Signalen unterscheiden lassen, ist die Zuordnung besonders bei 17B problematisch. Bei 17A sind beide Werte etwa gleich groß, sie lassen sich daher leicht zuordnen. Für 17B ergeben sich aber zwei Möglichkeiten: Bei der ersten Zuordnungsmöglichkeit ist C5 stärker hochfeldverschoben als bei 17A, folglich hat das Estercarbonylsignal etwa den gleichen Wert wie bei 17A. Für diese Zuordnung spricht die Beobachtung, daß bei 6β-halogensubstituierten 4-En-3-ketosteroiden eine stärkere Tieffeldverschiebung von C4 eine größere Hochfeldverschiebung von C5 zur Folge hat (s. Tab. 1). Für 17A betragen diese werte bei C4 +4.6, bei C5 -5.8 ppm; für 17B bei dieser Zuordnung dann bei C4 +6.3 und bei C5 -7.9 ppm. Das Estercarbonyl-C-Atom hat dann folglich etwa den gleichen Wert wie bei 17A. Gegenüber dem des CH-aciden Esters ist es um +2.8 ppm tieffeldverschoben, bei 17A beträgt dieses Inkrement +2.5 ppm.

Bei der zweiten Möglichkeit der Zuordnung ist das Estercarbonylsignal im Bezug zur CH-aciden Ausgangsverbindung bei 17B um 2.0 ppm schwächer tieffeldverschoben als bei 17A. C5 hat dann den gleichen Wert wie bei 17A. Die Werte mit den zugehörigen Inkrementen sind also: Estercarbonyl-C-Atom 163.2 (+0.5) und C5 165.5 (-5.6) ppm. Bei 17A gehört zum stärker hochfeldverschobenen Estermethylprotonensignal, das stärker tieffeldverschobene Estercarbonyl-C-Signal. Analog gehört bei 17B zum nur wenig hochfeldverschobenen Ester-H-Signal das nur schwach tieffeldverschobene C=O-Signal. Für diese Argumentation spricht, daß die deutlichen chromatographischen Unterschiede der beiden Diastereomeren durch den Substituenten verursacht werden müssen. Das zeigen auch die Inkremente der Estermethyl-H-Signale, obwohl die Estermethyl-C-Signale nicht verschoben sind. Es ist auch verständlich, daß bei gleichem Substituenten C5 seinen Wert

nicht ändert, zumal dieses C-Atom nur elektronisch beeinflußt werden kann, da es kein H-Atom für eine sterische Wechselwirkung zur Verfügung hat.

Bei den Phenylresten von beiden Isomeren unterscheiden sich in den ^{13}C-NMR-Spektren nur die Signale von C-e= 1' um 0.54 ppm. Die Zuordnung der Phenyl-Signale erfolgt in Analogie zu denen von Methylphenylsulfon[175].

Auch das Proton am ursprünglich aciden C-Atom C-a hat in den ^{1}H-NMR-Spektren bei beiden Isomeren den Wert 4.48 ppm. Es spaltet wegen der Kopplung mit H6α in ein Dublett auf. Bei 17A beträgt die Kopplungskonstante J = 12.3 Hz, bei 17B aber nur J = 11.4 Hz. Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind ebenfalls keine Unterschiede bei beiden Signalen festzustellen.

Die H4-Signale erscheinen bei beiden Isomeren als Singulett. Das bedeutet, daß in jedem Fall die Substituenten 6β-ständig sind. Bei 6α-Substitution würde H4 durch allylische Fernkopplung mit H6β zu einem Dublett mit einer Kopplungskonstante von 1.5 bis 2 Hz aufspalten[35]. Nach den Angaben von Collins et al.[15] beträgt sie beim 6α-Malonsäuredimethylesterderivat von Testosteron 1.2 Hz. Während H4 bei 17A den Wert von Testosteron hat, erfährt dieses Signal bei 17B eine Tieffeldverschiebung von +0.4 ppm. Bei 6β-Bromtestosteron ist H4 nur um +0.21 ppm tieffeldverschoben. In den ^{13}C-NMR-Spektren sind beide C4-Signale gegenüber Testosteron tieffeldverschoben. Während das Inkrement bei 17A mit +4.6 ppm in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen 6β-alkylierten Derivaten liegt, ist C4 bei 17B um +0.16 ppm stärker tieffeldverschoben als bei 17A. Der Grund für diese Verschiebung dürfte in der elektronischen Wechselwirkung des axialen Substituenten an C6 mit dem π-System der 4-En-3-on-Gruppierung zu suchen sein[35,36,114,115]. Wenn beim selben Substituenten bei 17B die Wechselwirkung größer ist als bei 17A, ist die Frage offen, ob die zusätzliche Wechsel-

wirkung elektronischer oder sterischer Natur ist. Wenn der letztere Fall zutrifft, wäre es interessant zu wissen, von welcher Gruppe des Substituenten sie hervorgerufen wird.

Für H19 wird bei 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden wegen der 1,3-diaxialen Wechselwirkung eine Tieffeldverschiebung erwartet[33]. So ist bei 6β-Bromtestosteron das H19-Signal um +0.39 ppm tieffeldverschoben, bei 17A ist es nur um +0.06 ppm tieffeld- und bei 17B sogar um -0.05 ppm hochfeldverschoben. In den ^{13}C-NMR-Spektren sind die C19-Signale von beiden Isomeren tieffeldverschoben; bei 17A beträgt das Inkrement +3.2 ppm, bei 17B +2.2 ppm. Bei 6β-Halogensubstitution nimmt die Tieffeldverschiebung von C19 von Fluor nach Brom zu: F (+1.3ppm); Cl (+3.9 ppm); Br (+4.8 ppm) (siehe Tab. 1). Da der Atomradius des C-Atoms zwischen dem von Fluor und Brom liegt, wird auch die Van-der-Waalsche Wechselwirkung mit der C19-Methylgruppe in etwa dazwischen liegen. Zusätzlich zu dieser 1,3-diaxialen Wechselwirkung dürfte bei 17A noch ein geringer zusätzlicher sterischer Einfluß vorhanden sein.

Von Bedeutung für die sterische Beeinflussung durch die Gruppen des Substituenten wären die Werte der ^{1}H-Signale von H7α und H7β. Leider lassen sie sich wegen der Aufspaltung in Multipletts, bedingt durch die Kopplung mit den benachbarten CH- und CH_2-Gruppen und dem damit verbundenen Intensitätsverlust nicht nachweisen. Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt, daß C7 bei 17A nur wenig tieffeldverschoben ist. Das Inkrement ist mit + 0.7 ppm in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen 6β-substituierten CC-verknüpften Derivaten, mit Ausnahme der noch stärker tieffeldverschobenen Malonesterderivate 20 und 21. Das C7-Inkrement von 17B übertrifft aber mit +3.6 ppm die Inkremente von 20 und 21 um 1.5 ppm. Bei den Malonesterderivaten kommt das zusätzliche Tieffeldverschiebungsinkrement ziemlich sicher durch sterische Wechselwirkung mit einer der beiden Methylestergruppen zustande.

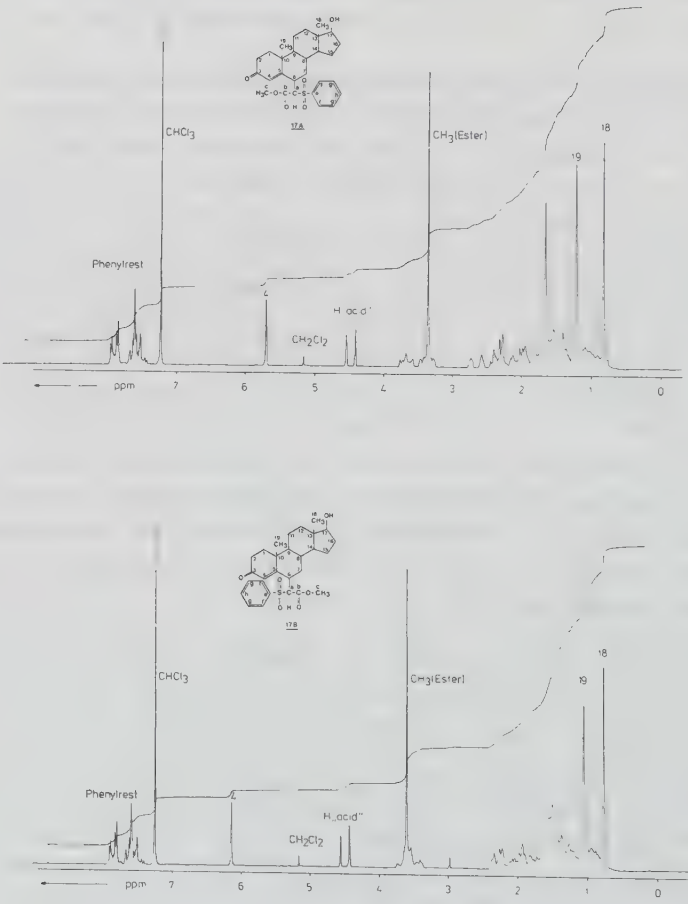


Abb. 40: ^{1}H-NMR-Spektren (90 MHz) von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A (oben) und dem Stereoisomeren 17B (unten) in $CDCl_3$

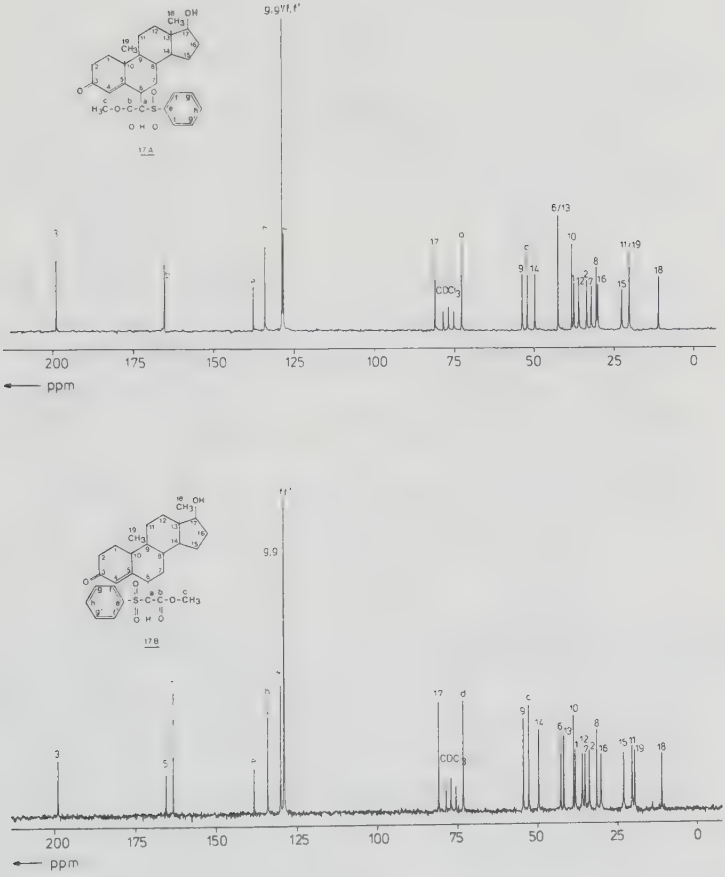
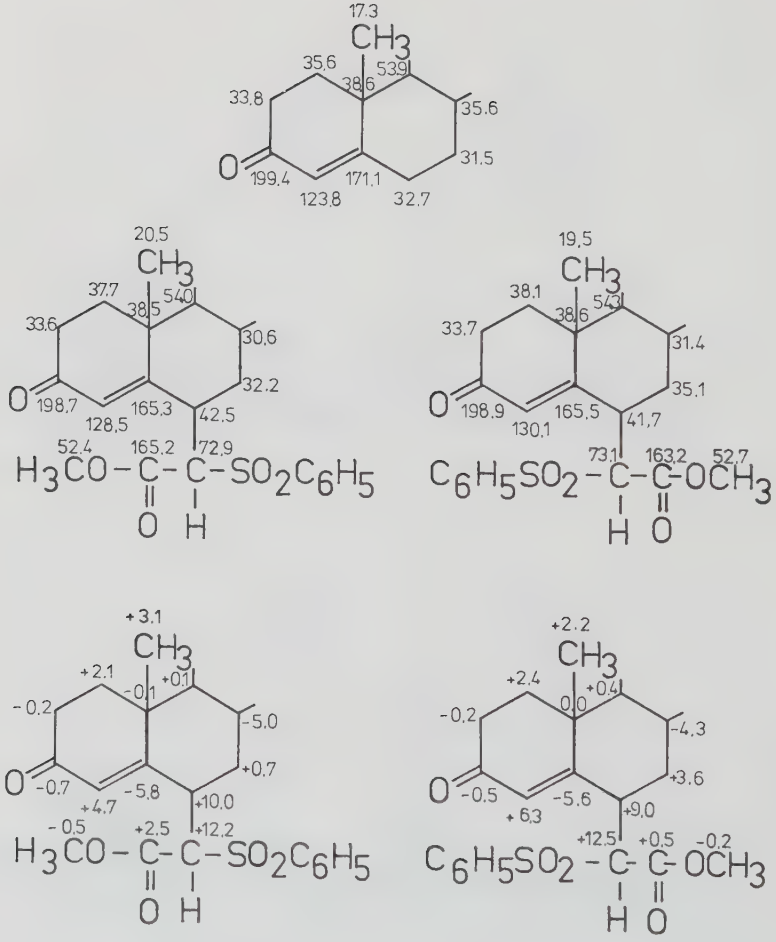


Abb. 41: ^{13}C-NMR-Spektren (protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz) von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonyl-essigsäuremethylester 17A und dem Stereoisomeren 17B; je ca. 120 mg in 1 ml $CDCl_3$; 17A: 6800, 17B: 5300 Pulsinterferogramme



17A

17 B

Abb. 42: ^{13}C-Zuordnungen (nach Tab. 32) und Verschiebungsinkremente (nach Tab. 34) von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A und dem Stereoisomeren 17B

Man kann also folgern, daß auch bei 17B das große C7-Inkrement durch Wechselwirkung von H7α und H7β oder beiden mit der Methylestergruppe bewirkt wird. Dem kommt entgegen, daß bei 17A nach dem Röntgenstrukturbild die Estergruppe auf die andere Seite, also zum A-Ring zeigt. Andererseits sind im Substituenten im Prinzip viele Bindungen frei drehbar, sodaß bei 17A in Lösung auch eine andere Konformation als die durch Röntgenstruktur im Kristall bestimmte, denkbar wäre.

Trotz der vielen unterschiedlichen spektroskopischen Daten kann die Frage nicht eindeutig beantwortet werden, ob bei 17B an C-a ebenfalls S-Konfiguration wie bei 17A oder R-Konfiguration vorliegt.

2.7. Testosteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 18/2 und das Nebenprodukt Androst-4-en-3,17-dion 18/1

Das 6β-Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivat von Testosteron 18/2 läßt sich nur mit geringer Ausbeute,nach Mitteldruckflüssigkeitschromatographie mit Hexan/Ethylacetat als Elutionsmittel,darstellen. Es kristallisiert nur mikrokristallin und ist leicht zersetzlich, sodaß es schwierig ist, eine gute Elementaranalyse zu erhalten. Bei der Chromatographie wird vor dem Hauptprodukt 18/2 ein Nebenprodukt 18/1 mit ganz geringer Ausbeute und nicht reproduzierbar eluiert. Während 18/2 im Massenspektrum den erwarteten Molekülpeak zeigt, fehlt im Molekülpeak von 18/1 eine Masseneinheit; das Molekül hat also ein H-Atom weniger als 18/2.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 43) von 18/1 ist H18 gegenüber dem von 18/2 um +.014 ppm tieffeldverschoben. Das Triplettsignal für H17α fehlt im Spektrum.

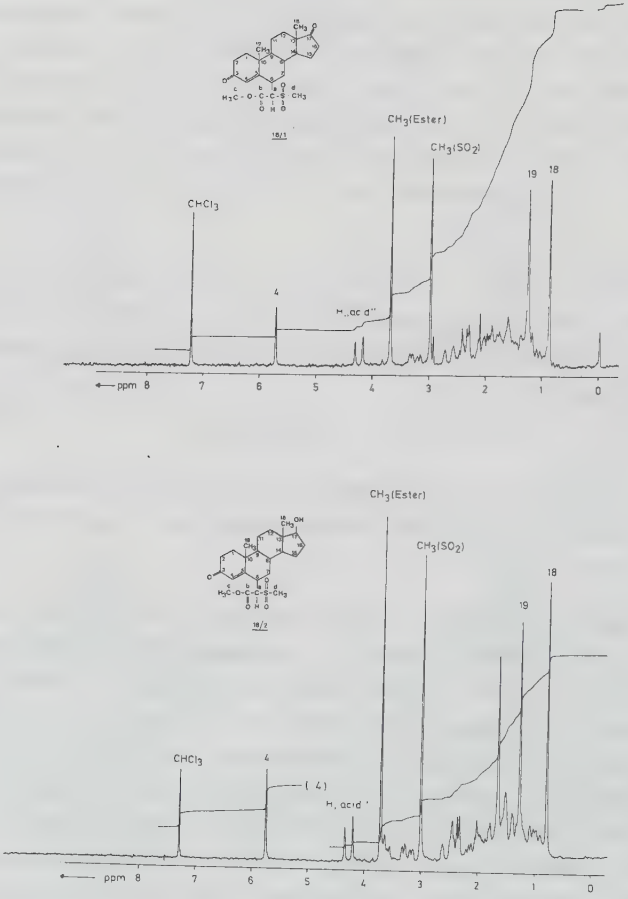


Abb. 43: ^{1}H-NMR-Spektren (90 MHz) von Testosteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 18/2 (unten) und von Androst-4-en-3,17-dion-6β-yl-methylsulfonyl-essigsäuremethylester 18/1 (oben) in $CDCl_3$

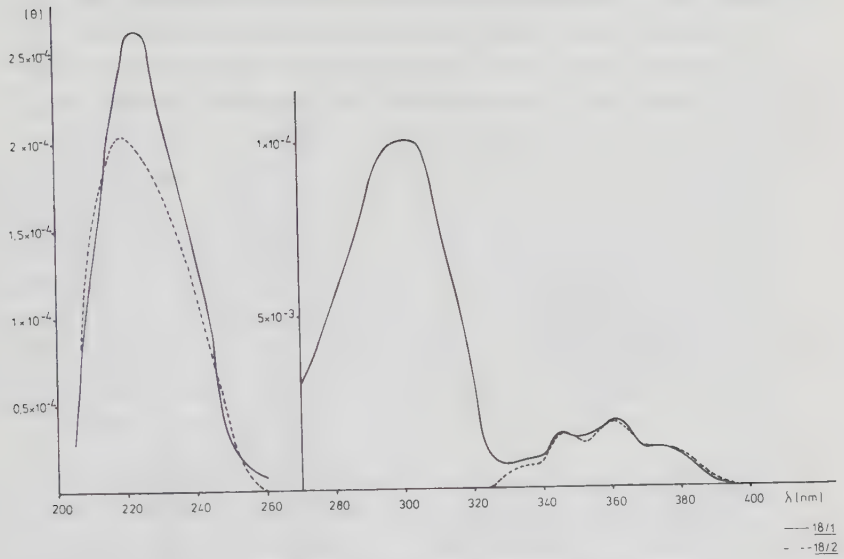


Abb. 44: CD-Spektren von Testosteron-6β-yl-methylsulfonyl-essigsäuremethylester 18/2 und von Androst-4-en-3,17-dion-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 18/1 in Dioxan

Im CD-Spektrum (Abb. 44) tritt bei 300 nm ein positiver Cottoneffekt einer gesättigten Carbonylgruppe auf. Die Intensität liegt in der gleichen Größenordnung wie bei der Carbonylbande der C20 Carbonylgruppe von Progesteron oder den Progesteronderivaten 19/1 und 19/2, deren positiver Cottoneffekt bei 290 nm liegt.

Bei 18/1 muß es sich also um das 17-Ketoderivat von 18/2 handeln, das wahrscheinlich durch Oxidation der sekundären OH-Gruppe an C17 durch das Lösungsmittel DMSO entstanden ist.

Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind bei der jetzt getroffenen Zuordnung, die aber noch nicht endgültig ist, die Signale für C15 und C17 gegenüber 18/2 hochfeldverschoben, das Signal für C18 tieffeldverschoben. Für C15 beträgt das Inkrement -1.7 ppm, für C17 sogar -34.1 ppm und für C18 +2.6 ppm. In Abb. 45 ist das ^{13}C-NMR-Spektrum von 18/2 dargestellt.

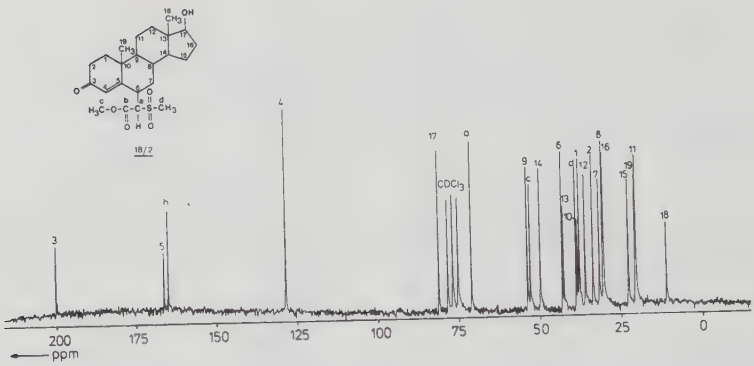


Abb. 45: ^{13}C-NMR-Spektrum (protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz; 18 879 Pulsinterferogramme) von Testosteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 18/2; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$

2.8. Progesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 19/2 und das Nebenprodukt Isoprogesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 19/1

2.8.1. Die chromatographische Trennung der 17α- und 17β-Epimeren

Auch bei diesem Alkylierungsansatz wird in der Mitteldruckflüssigkeitschromatographie an zwei hintereinandergeschalteten Kieselgel-Fertigsäulen mit Hexan/Ethylacetat als Elutionsmittel vor dem Hauptprodukt 19/2 das Nebenprodukt 19/1 eluiert. 19/2 kristallisiert mikrokristallin, während 19/1 harte flache Kristalle bildet. In den FD-MS- und MS-Spektren von 19/1 und 19/2 sind die Molekülpeaks und die Peaks für M^+-79 entsprechend M^+-CH_3SO_2 vorhanden.

Wie unten gezeigt wird, handelt es sich bei 19/1 und 19/2 um 17α- und 17β-Epimere. Die chromatographische Trennung von 17α-/17β-Epimerengemischen ist normalerweise schwierig. So konnte das oben schon zitierte Fukujusonoron[49], das ebenfalls ein 17α-/17β-CH_3CO-Epimerengemisch darstellt durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nur partiell in zwei Komponenten getrennt werden[116]. Entsprechend zu diesem chromatographischen Verhalten zeigen die Doppelsignale im ^{13}C-NMR-Spektrum nur geringe Unterschiede[49]. Im Gegensatz dazu haben, wie im nächsten Abschnitt ausgeführt wird, die ^{13}C-Signale bei 19/1 und 19/2 von C20 und C21 und den C-Atomen in der Umgebung des Substituenten beachtliche Inkremente. Die gute präparative Trennung von 19/1 und 19/2 wird offensichtlich erst durch die polare Methylsulfonylgruppe im 6β-Substituenten möglich.

2.8.2. Die ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektren

Vergleicht man das ^1H-NMR-Spektrum des Nebenprodukts 19/1 mit dem des Hauptprodukts 19/2, fällt auf, daß bei 19/1 das

H18-Signal um +0.29 ppm tieffeldverschoben ist. Im ^{13}C-NMR-Spektrum ist C18 sogar um +7.6 ppm tieffeldverschoben; das C18-Signal "überholt" damit das C19-Signal um 0.1 ppm und fällt mit C11 zusammen. Offensichtlich hat der $COCH_3$-Substituent an C17 bei 19/1 eine andere räumliche Anordnung als bei 19/2. Die Vermutung, daß es sich bei 19/1 um das 17α-Epimere handelt, wird durch die besonders große Hochfeldverschiebung der C12- und C14-Signale bestätigt. Sie ist eine Folge der 1,3-diaxialen Wechselwirkungen des α-ständigen $COCH_3$-Substituenten mit H12α und H14α und ist mit -5.6 und -6.5 ppm offensichtlich noch stärker ausgeprägt als diejenige des 6β-Substituenten mit H8β mit -4.7 ppm im selben Molekül (s. Tab. 28).

Tab. 28: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente des 17α-Isoprogesteronderivates 19/1 für die Signale des C- und D-Ringes und der Substituenten an C17 und C13

C-Atom	19/1
12	- 5.6
13	+ 1.5
14	- 6.5
15	0.0
16	+ 2.7
17	- 2.4
18	+ 7.7
20	+ 3.5
21	+ 3.3

Zur Erklärung muß man eine intramolekulare Van-der-Waals-Abstoßung zwischen diesen beiden axialen H-Atomen und den H-Atomen der C21-Methylgruppe annehmen. Dabei kommen sich die Wasserstoffatome so nahe, daß die σ-Elektronen der CH-

Bindung zum Kohlenstoff hin verschoben werden. Die höhere Elektronendichte führt dann zu einer zusätzlichen Abschirmung dieser Kohlenstoffatome und damit zu einer Hochfeldverschiebung der ^{13}C-Signale[117].

Das C18-Inkrement erscheint in der Tab. 28 als stark tieffeldverschoben, weil die Inkrementtabelle durch die Differenz Progesteron (β-$COCH_3$-Gruppe) minus 19/1 (α-$COCH_3$-Gruppe) bestimmt wird. Beim "normalen" 17β-Derivat findet die oben genannte intramolekulare Van-der-Waal-Abstoßung zwischen den H-Atomen der C18- und der C21-Methylgruppe statt. Das ist aus dem Molekülmodell ersichtlich und aus der Publikation von Wittstruck und Williams[118] an Untersuchungen von 17α- und 17β-Hydroxysteroiden bekannt. Es wäre daher sinnvoller, das Inkrement durch die Differenz 18-nor-Derivat minus 19/1 zu bestimmen. Das ist aber nicht möglich, da die ^{13}C-NMR-Daten eines entsprechenden 18-nor-Derivats nicht zur Verfügung stehen. In diesem Fall müßte dann C18 als Hochfeldverschiebung in der Tabelle aufgeführt sein. Auch wenn man die Differenz 19/1 (17α-Substituent) minus 19/2 (17β-Substituent) bildet, resultiert eine Hochfeldverschiebung für C18 (-7.7 ppm). Ebenso sind dann C21 (-3.4 ppm) und C20 (-3.5 ppm) hochfeldverschoben. Je nach Drehung des $COCH_3$-Substituenten um die C17-C20-Achse kommt nämlich nicht nur eine Wechselwirkung der C21-Methylgruppe sondern auch der C20-Carbonylgruppe mit der C18-Methylgruppe in Betracht.

Problematisch ist die Zuordnung der Signale 25.4 und 24.3 ppm zu C16 und C15 beim 17α-Derivat. Wenn man die Differenz der chemischen Verschiebungen 17α- minus 17β-Derivat bildet, resultieren bei beiden Zuordnungsmöglichkeiten Tieffeldverschiebungen: C16 25.4 (+2.7) ppm, C15 24.3 (0.0 ppm) bzw. C16 24.3 (+1.5) ppm, C15 25.4 (+1.6) ppm. Nach dem Modell ist die sterische Wechselwirkung des Substituenten an C17 mit den H-Atomen von C16 beim 17α- und 17β-Derivat etwa gleich. Es zeigt sich außerdem, daß die H-Atome an C15 nur

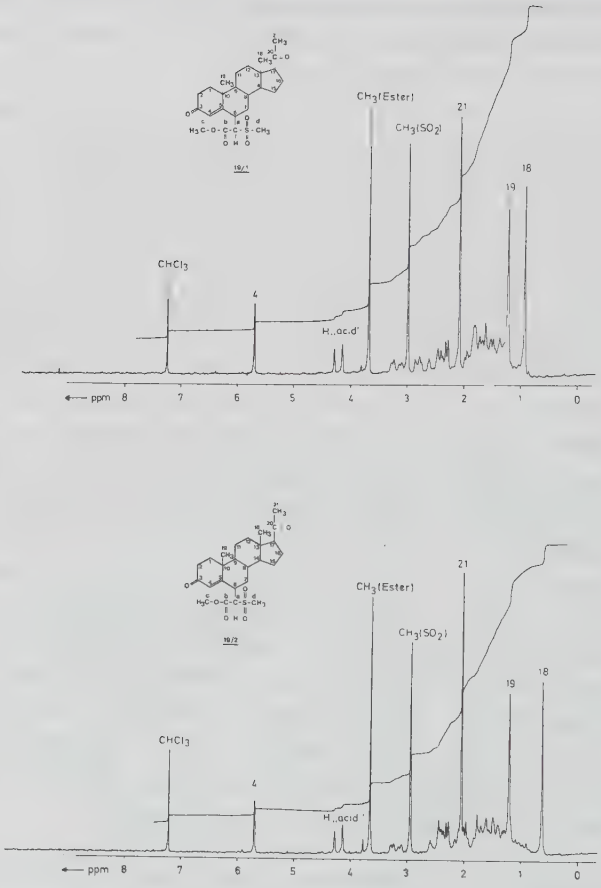


Abb. 46: ^{1}H-NMR-Spektren (90 MHz) von 17β-Progesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 19/2 und des Stereoisomeren 17α-Isoprogesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylesters 19/1 in $CDCl_3$

noch unwesentlich vom 17α-Substituenten beeinflußt werden; die Wechselwirkung dürfte allerdings beim 17α-Derivat etwas größer sein als beim 17β-Steroid. Das würde mit einer geringeren Tieffeldverschiebung bei 19/1 in Einklang stehen. Zieht man die Daten von Wittstruck und Williams[118] für 17α- und 17β-Hydroxysteroide zur Entscheidungshilfe heran und bildet die Inkremente 19/2 minus 19/1, so ergibt sich für C16 eine wesentlich stärkere Tieffeldverschiebung als für C15, daher wird die zuerst genannte Zuordnung getroffen. Sie kann allerdings noch nicht als endgültig betrachtet werden.

Die Zuordnungen der ^{13}C-Signale zu C5 und den Estercarbonyl-C-Atomen wird bei 19/1 und 19/2 wie bei 17B und 20 auf Grund der Inkremente zu den entsprechenden CH-aciden Estern getroffen. Wenn C6 eine große Tieffeldverschiebung aufweist, hat C5 eine große Hochfeldverschiebung. Der Wert von 166.3 (-4.38) ppm bei 19/2 paßt unter diesem Aspekt gut zu den C5-Zuordnungen bei den anderen Derivaten. Auch der etwas höhere Wert des Estermethyl-C-Signals paßt gut zum niedrigeren Estercarbonyl-C-Wert.

2.8.3. Die CD-Spektren

Den besten Beweis für das 17α-Epimere 19/1 liefert die CD-Messung. Während beim 17β-Derivat 19/2 die Carbonylbande der C2O-C=O-Gruppe einen positiven Cottoneffekt bei 292 nm mit einer molaren Elliptizität von +9340 hat, erfolgt bei der entsprechenden Bande von 19/1 eine Vorzeichenumkehr des Cottoneffektes; das negative Maximum liegt bei 290 nm und hat eine molare Elliptizität von -6530 (siehe Tab. 37). Der Betrag der molaren Elliptizität liegt auch im Reproduktionsversuch beim 17α-Derivat niedriger als beim 17β-Derivat.

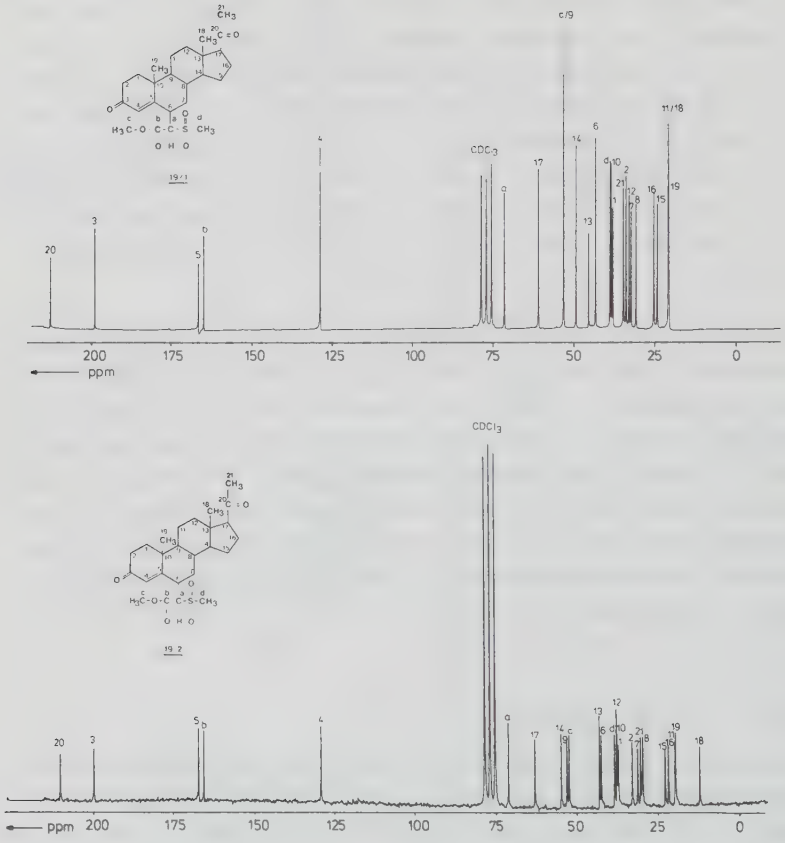


Abb. 47: ^{13}C-NMR-Spektren (protonenbreitbandentkoppelt; 20.115 MHz) von 17β-Progesteron-6β-yl-methylsulfonyl-essigsäuremethylester 19/2 und des Stereoisomeren 17α-Isoprogesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäure-methylesters 19/1; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$; 19/2: 155 935, 19/1: 186 322 Pulsinterferogramme

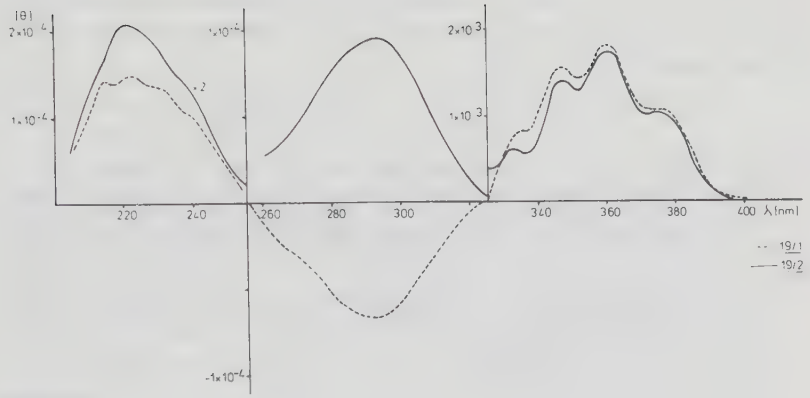


Abb. 48: CD-Spektren von 17β-Progesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 19/2 und von 17α-Isoprogesteron-6β-yl-methylsulfonylessigsäuremethylester 19/1 in Dioxan

2.8.4. Die Schmelzpunkte und Drehwerte

Schon in der 30er-Jahren sind 17α-Pregnanderivate von Butenandt und Mitarb. gefunden worden[119-122]. Eine partielle Epimerisierung wird durch Behandeln der normalen 17β-Verbindungen mit 5 %igem methanolischem Kaliumhydroxid bewirkt. Diesen Autoren gelang auch die Synthese von Isoprogesteron (17α-Progesteron)[122]. Damals wurden die 17α- von den 17β-Epimeren hauptsächlich durch Schmelzpunkt- und vor allem Drehwertmessungen unterschieden. Die Schmelzpunkte unterscheiden sich zwar beträchtlich (17° bis 65°C), sind aber teils bei den 17α- teils bei den 17β-Epimeren höher. Bei

19/2 bzw. 19/1 betragen sie 168°-169°C bzw. 187°-189°C; sie unterscheiden sich also um 20°C. Die 17α-Epimeren drehen alle stärker nach links als die 17β-Derivate. Die Beträge der Drehwertdifferenzen sind fast alle in der gleichen Größenordnung (Tab. 29).

Tab. 29: Vergleich einiger Drehwerte und der Differenz der Beträge dieser Drehwerte von 17α- und 17β-Verbindungen aus der Pregnanreihe mit denen von 19/1 und 19/2
Vergleichswerte nach Fieser und Fieser, Tab. 17.9 S. 617[119)]

	17β $[\alpha]_D$	17α $[\alpha]_D$	Betrag $\Delta [\alpha]_D$
Progesteron	+192°(EtOH)	0°(EtOH)	192°
Pregnan-5-en-3β-ol-20-on	+ 28°(EtOH)	-140°(EtOH)	112°
3β-Acetoxy-pregnan-5-en-20-on	+ 20°(EtOH)	-126°(EtOH)	106°
5α-Pregnan-3β-ol-20-on	+ 89°(EtOH)	+ 6°(EtOH)	83°
5α-Pregnan-3,20-dion	+122°(EtOH)	- 15°(EtOH)	107°
19/1 bzw. 19/2	+122.7°(Dioxan)	+ 17.1°(Dioxan)	105.6°

Auch von den 17-Hydroxy- bzw. Acetoxy-Epimeren sind Untersuchungen bekannt[123)]. Bei den 17β-Acetoxyderivaten kommt es aber im Gegensatz zu den 17β-Hydroxy-Steroiden nicht zu einer sterischen Behinderung mit der C18-Methylgruppe, da

beide Reste gauche (skew) stehen. Bei den 17α-Acetoxyderivaten kommt es dagegen zu 1,3-diaxialen Wechselwirkungen des Substituenten mit H12 und H14.

2.9. Die ^{13}C-NMR-Spektren der 6β-substituierten Testosteron- und Progesteronderivate

Obwohl schon in den vorangegangenen Abschnitten bei den einzelnen Steroidesterderivaten einige charakteristische ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren gezeigt und diskutiert worden sind, werden hier die wichtigsten ^{1}H-NMR-Daten (Tab. 30 und 31) und die ^{13}C-chemischen Verschiebungen aller untersuchten Derivate (Tab. 32 und 33) zusammengestellt. In diesem Abschnitt sollen einige allgemeine Aspekte der ^{13}C-chemischen Verschiebungen und ihrer Zuordnung betrachtet werden. Tab. 34 und 35 geben die Verschiebungsinkremente zu Testosteron bzw. Progesteron wieder.

Die Spektren weisen für jedes C-Atom nur ein Signal auf; Die Produkte sind also rein und stereochemisch einheitlich. Die Zuordnung der Signale erfolgt durch Vergleich mit den Ausgangssteroiden Testosteron und Progesteron[88,113]. Die chemischen Verschiebungen der Signale der C-Atome der C- und D-Ringe sind unverändert innerhalb der Fehlergrenzen. Die Signale der A- und B-Ring-C-Atome sind mit Ausnahme derjenigen von C2, C10 und C9 beträchlich tief- oder hochfeldverschoben. Da im tiefen Feld nur wenige Signale vorhanden sind (C3, C5, die Estercarbonyl-C-Atome und C4) können diese auch unter Zuhilfenahme der aus den Off-resonance-Spektren erhaltenen Multiplizitäten zugeordnet werden. Die nahe beieinanderliegenden Signale von C5 und den Estercarbonyl-C-Atomen lassen sich allerdings nicht unterscheiden, da sie quartären C-Atomen angehören und daher in Off-resonance-Spektrum als Singuletts erscheinen. Von den 6β-Malonsäuremethylesterderivaten von Testosteron 20

Tab. 30: Die wichtigsten chemischen Verschiebungen (δ; ppm; 90 MHz; $CDCl_3$) in den ^{1}H-NMR-Spektren der 6β-substituierten Testosteronderivate 17A, 17B, 18/1, 18/2 und 20

	Testo	MMT 20	PSET/A 17A	PSET/B 17B	MSET/1 18/1	MSET/2 18/2
H18	0.75(s;3H)	0.79(s;3H)	0.83(s;3H)	0.76(s;3H)	0.93(s;3H)	0.79(s;3H)
H19	1.15(s;3H)	1.26(s;3H)	1.21(s;3H)	1.05(s;3H)	1.30(s;3H)	1.26(s;3H)
$CH_3(SO_2)$					3.02(s;3H)	2.99(s;3H)
CH_3(Ester)		3.63(s;3H)	3.35(s;3H)	3.58(s;3H)	3.72(s;3H)	3.70(s;3H)
CH_3(Ester)		3.74(s;3H)				
H"acid"		3.81(d;1H)	4.46(d;1H)	4.47(d;1H)	4.27(d;1H)	4.25(d;1H)
		J=12.3 Hz	J=12.3 Hz	J=11.2 Hz	J=12.3 Hz	J=12.3 Hz
H4	5.67(s;1H)	5.79(s;1H)	5.69(s;1H)	6.12(s;1H)	5.74(s;1H)	5.71(s;1H)
H aromat.			7.53-7.95	7.49-7.89		

Tab. 31: Die wichtigsten chemischen Verschiebungen (δ; ppm; 90 mHz; $CDCl_3$) in den ^{1}H-NMR-Spektren der 6β-substituierten Progesteronderivate 19/1, 19/2 und 21

	Prog	MMP 21	MSEP/1 19/1	MSEP/2 19/2
H18	0.64(s;3H)	0.66(s;3H)	0.97(s;3H)	0.70(s;3H)
H19	1.16(s;3H)	1.25(s;3H)	1.26(s;3H)	1.28(s;3H)
H21	2.10(s;3H)	2.10(s;3H)	2.11(s;3H)	2.10(s;3H)
$CH_3(SO_2)$			3.01(s;3H)	3.00(s;3H)
CH_3(Ester)		3.62(s;3H)	3.70(s;3H)	3.71(s;3H)
CH_3(Ester)		3.73(s;3H)		
H "acid"		3.80(d;1H)	4.23(d;1H)	4.25(d;1H)
		J=11.4 Hz	J=12.3 Hz	J=12.3 Hz
H4	5.71(s;1H)	5.79(s;1H)	5.71(s;1H)	5.74(s;1H)

und Progesteron 21 sind die Zuordnungen der Signale im tiefen Feld aus der Arbeit von Collins et al.[15] schon teilweise bekannt. Der Wert mit der größeren chemischen Verschiebung wird daher C5 zugeordnet. Die wichtigste Zuordnungshilfe besonders für C1 und C8 sind wieder die Daten von Holland und Thomas[36] von 6α- und 6β-Fluor- und Chlor-4-en-3-keto-steroiden (s. Tab. 1).

Sowohl das acide C-Atom des Substituenten als auch C6 erfahren nach der Alkylierung eine starke Tieffeldverschiebung, da beide vom sekundären zum tertiären C-Atom umgewandelt werden. Beide Signale zeigen daher ein Dublett im Off-resonance-Spektrum. Das CH-acide C-Atom C-a erfährt nach der elektrophilen Substitution mit dem Steroidrest eine Multiplizitätsänderung und damit eine Tieffeldverschiebung von 12.2 bis 14.3 ppm, je nach der Acidität der dem Ester entsprechenden Carbonsäuren. Je stärker acid die Säure, desto größer das Inkrement. Diese Tieffeldverschiebung hat eine geringe Hochfeldverschiebung des Estercarbonyl-C-Atoms zur Folge.

Naturgemäß ist die Tieffeldverschiebung bei C6 am größten von allen C-Atomen des Steroidgerüsts. Bei den CC-verknüpften Substituenten ist sie mit 9.0 bis 10.7 ppm nur etwa halb so groß wie bei den Bromderivaten mit 19.3 ppm.

Die Signale der an C6 anschließenden C-Atome C5, C4 und C3 sind alternierend hoch-, tief- und hochfeldverschoben. Bei C5 ist der Bereich von -2.9 bis -5.8 ziemlich groß, d.h. der jeweilige Substituent bestimmt die Größe der Hochfeldverschiebung. Je acider die dem Ester zugrunde liegende Carbonsäure, d.h. je stärker der -I-Effekt der CH-aciden Verbindung, desto stärker wird das quartäre C5 abgeschirmt. Bei den mit dem Phenylsulfonylessigsäuremethylester substituierten Steroiden ist das Inkrement etwa gleich groß wie bei den mit Brom substituierten. Der Betrag der Verschiebung ist aber im Vergleich zu dem bei C6 etwa nur halb so groß.

Tab. 32: ^{13}C-chemische Verschiebungen der 6β-substituierten Testosteronderivate 17A, 17B, 18/1, 18/2 und 20 in $CDCl_3$

C-Atom	Testo	MMT 20	PSET/A 17A	PSET/B 17B	MSET/1 18/1	MSET/2 18/2
1	35.6	37.7	37.7	38.1	37.9	38.0
2	33.9	33.7	33.6	33.7	33.7	33.8
3	199.4	199.0	198.7	198.9	198.5	198.7
4	123.8	128.1	128.4	130.1	128.8	128.6
5	171.1	167.0	165.3	165.5	166.3	166.2
6	32.7	43.3	42.5	41.7	43.0	43.2
7	31.5	33.6	32.2	35.1	31.0	31.9
8	35.6	30.8	30.6	31.4	31.0	30.7
9	53.9	53.6	54.0	54.3	53.9	54.0
10	38.6	38.3	38.5	38.6	38.5	38.6
11	20.6	20.4	20.5	20.3	20.2	20.6
12	36.4	36.1	36.1	36.0	35.5	36.3
13	42.8	42.6	42.5	42.6	42.6	42.8
14	50.5	50.0	49.9	49.6	50.3	50.1
15	23.2	23.0	22.8	22.8	21.3	23.0
16	30.4	30.1	30.2	29.9	30.2	30.4
17	81.5	81.1	81.2	80.9	47.4	81.5
18	11.0	10.9	11.0	11.0	13.7	11.1
19	17.3	20.1	20.5	19.5	20.9	20.8
a		55.9	72.9	73.1	71.1	71.4
b		167.9	165.2	163.2	164.3	164.9
b'		167.4				
c		52.5	52.4	52.7	53.2	53.2
c'		52.3				
d					39.0	39.1
e			137.8	138.4		
f,f'			128.9	128.9		
g,g'			128.9	129.1		
h			134.2	134.1		

Tab. 33: ^{13}C-chemische Verschiebungen der 6β-substituierten Progesteronderivate 19/1, 19/2 und 21 in $CDCl_3$

C-Atom	Prog	MMP 21	MSEP/1 19/1	MSEP/2 19/2
1	35.6	37.6	37.9	37.9
2	33.8	33.7	33.8	33.7
3	199.0	198.6	198.5	198.6
4	123.8	128.2	128.6	128.7
5	170.7	166.4	166.2	166.3
6	32.6	43.2	43.2	43.1
7	31.8	33.9	32.2	32.1
8	35.4	30.7	30.7	30.5
9	53.5	53.3	53.1	53.7
10	38.4	38.2	38.4	38.3
11	20.9	20.7	20.8	20.9
12	38.4	38.2	32.8	38.4
13	43.7	43.6	45.3	43.7
14	55.8	55.4	49.3	55.4
15	24.3	24.0	24.3	23.8
16	22.7	22.6	25.4	22.8
17	63.3	63.2	60.9	63.3
18	13.1	13.1	20.8	13.2
19	17.2	20.0	20.7	20.7
20	208.9	208.7	212.4	208.9
21	31.3	31.1	34.6	31.2
a		55.7	71.4	71.3
b		167.8	164.6	164.7
b'		167.2		
c		52.4	53.1	53.1
c'		52.3		
d			38.8	39.1

Tab. 34: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente der 6β-substituierten Testosteronderivate 4, 17A, 17B, 18/1, 18/2 und 20
a: Inkrement zum CH-aciden C-Atom
b,b': Inkremente zum Estercarbonyl-C-Atom der CH-aciden Ausgangsverbindung

C-Atom	MMT 20	PSET/A 17A	PSET/B 17B	MSET/1 18/1	MSET/2 18/2	6βBrTHP-Testo 4
1	+ 2.1	+ 2.1	+ 2.5	+ 2.3	+ 2.4	+ 2.2
2	- 0.2	- 0.3	- 0.2	- 0.2	- 0.1	+ 0.2
3	- 0.4	- 0.7	- 0.5	- 0.9	- 0.7	- 0.1
4	+ 4.3	+ 4.6	+ 6.3	+ 5.0	+ 4.8	+ 3.1
5	- 4.1	- 5.8	- 5.6	- 4.8	- 4.9	- 5.4
6	+10.6	+ 9.8	+ 9.0	+10.3	+10.5	+19.4
7	+ 2.1	+ 0.7	+ 3.6	- 0.5	+ 0.4	+ 9.0
8	- 4.8	- 5.0	- 4.2	- 4.6	- 4.9	- 5.0
9	- 0.3	+ 0.1	+ 0.4	0.0	+ 0.1	- 0.7
10	- 0.3	- 0.1	0.0	- 0.1	0.0	- 0.2
19	+ 2.8	+ 3.2	+ 2.2	+ 3.6	+ 3.5	+ 4.9
a	+15.0	+12.2	+12.4	+12.3	+12.5	
b	+ 1.2	+ 2.5	+ 0.5	+ 1.0	+ 1.6	
b'	+ 0.7					

Tab. 35: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente der 6β-substituierten Progesteronderivate 1, 19/1, 19/2 und 21

a: Inkrement zum CH-aciden C-Atom

b,b': Inkremente zum Estercarbonyl-C-Atom der CH-aciden Ausgangsverbindung

C-Atom	MMP 21	MSEP/1 19/1	MSEP/2 19/2	6βBr-Prog 1
1	+ 2.0	+ 2.3	+ 2.3	+ 2.2
2	- 0.1	0.0	- 0.1	+ 0.3
3	- 0.4	- 0.5	- 0.4	+ 0.3
4	+ 4.4	+ 4.8	+ 4.9	+ 3.2
5	- 4.3	- 4.5	- 4.4	- 5.5
6	+10.6	+10.6	+10.5	+19.3
7	+ 2.1	+ 0.4	+ 0.3	+ 8.9
8	- 4.7	- 4.7	- 4.9	- 4.8
9	- 0.2	- 0.4	+ 0.2	- 0.7
10	- 0.2	0.0	- 0.1	0.0
19	+ 2.8	+ 3.5	+ 3.5	+ 4.9
a	+14.8	+12.6	+12.5	
b	+ 1.1	+ 1.3	+ 1.4	
b'	+ 0.5			

Bei C4 beträgt das Inkrement 4.4 bis 5.1 ppm bei den CC-verknüpften Substituenten. Da die 6β-Bromderivate ein um 1.2 bis 2.0 geringeres Inkrement haben, kommt hier möglicherweise eine sterische Wechselwirkung des CC-verknüpften Substituenten mit dem vinylischen Wasserstoffatom an C4 zur Geltung.

Bei C3 bleiben die Inkremente der erwarteten Hochfeldverschiebung mit 0.4 bis 0.9 ppm bei den CC-verknüpften Substituenten bzw. mit 0.1 bis 0.3 ppm bei den Bromderivaten unter einem ppm.

Die Tieffeldverschiebung bei C1 bzw. die Hochfeldverschiebung bei C8 liegen mit +2.0 bis +2.5 bzw. -4.2 bis -5.0 ppm in einem engen Bereich, d.h. die Inkremente sind unabhängig von der Art des Substituenten charakteristisch für axiale 6β-Substituenten, ebenso wie die Tieffeldverschiebung bei C4.

Bei C7 haben die Inkremente der Tieffeldverschiebung einen großen Bereich. Sie scheinen sowohl von sterischen als auch von elektronischen Einflüssen abzuhängen. Bei aliphatischen oder alicyclischen C-Atomen, die einem C-Atom mit elektronenziehenden Substituenten benachbart sind, sind Tieffeldverschiebungen von dieser Größenordnung zu erwarten[123].

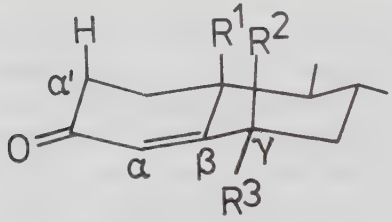
Bei der C19-Methylgruppe an C10 ist die 1,3-diaxiale sterische Wechselwirkung mit 6β-Substituenten wie erwartet deutlich von der Art des Substituenten abhängig. Mit 2.2 bis 3.6 ppm sind die Inkremente bei den CC-verknüpften Substituenten kleiner als bei den Bromderivaten (4.9 ppm).

2.10. Die CD-Spektren der 6β-substituierten Testosteron- und Progesteronderivate

2.10.1. Der $n \rightarrow \pi^*$-Übergang[124-126]

In α, β-ungesättigten Ketonen gehen eine oder beide Symmetrieebenen um die Carbonylgruppe verloren, sodaß die für gesättigte Ketone bewährte Octantenregel nicht mehr gültig ist[127]. Snatzke[128-130] hat daher für α, β-ungesättigte Ketone die Octantenregel modifiziert, sodaß auch für nicht planare konjugierte Ketone, also transoide und cisoide

cyclische Enone theoretische Voraussagen über das Vorzeichen des Cottoneffektes der R-Bande gemacht werden können. Diese Regeln sind dann an Beispielen aus der Steroidreihe bestätigt worden. Bei unsubstituierten 4-En-3-ketosteroiden, deren A-Ring einem transoiden Cyclohexenon entspricht, hat der $n \rightarrow \pi^*$-Übergang einen negativen Cottoneffekt. Im Mittel ist ε max. = -1.35, entsprechend $[\theta]$ = -4 455. Das bedeutet, der A-Ring nimmt eine ganz bestimmte Halbsesselkonformation ein.



Wenn bei 4-En-3-ketosteroiden das axiale 6β-H-Atom (R^2 in der Abb.) durch die Substituenten CH_3, Br, J oder S-Acetyl ersetzt ist, erfährt der Cottoneffekt eine Vorzeichenumkehr, d.h. er wird positiv. Bei den 6β-Substituenten F, OH und O-Acetyl erfolgt dagegen keine Umkehr des $n \rightarrow \pi^*$-Übergangs. Dagegen bewirken alle genannten 6β-Substituenten eine Vorzeichenumkehr des $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergangs (K-Bande), wie unten noch diskutiert wird. Ersetzen die genannten Substituenten das 6α-H-Atom (R^3 in der Abb.), behalten die Cottoneffekte bei beiden Übergängen ihre Vorzeichen bei.

Das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen 6β-Substituenten bei $n \rightarrow \pi^*$-Übergang wird von Snatzke[129] in einer frühen Publikation so interpretiert, daß die zuerst genannten Substituenten eine große Raumerfüllung aufweisen,

und daher durch Wechselwirkung mit der C19-Gruppe eine Anhebung von C3 bewirken, was zu einer Umkehr des Schraubungssinns des 3-On-4-en-Chromophors und damit zu einem positiven Cottoneffekt führt. Die Substituenten kleiner Raumerfüllung der zweiten Gruppe sind zu einer solchen Wechselwirkung nicht in der Lage. Gestützt wird diese Hypothese durch die aus der ^{1}H-NMR-Spektroskopie bekannten Tieffeldverschiebungen von H19 bei 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden[33].

Ist bei 4-En-3-ketosteroiden die β-ständige C19-Methylgruppe an C10 durch ein ebenfalls axiales H-Atom oder eine OH-Gruppe ersetzt, erfolgt keine Vorzeichenumkehr. Snatzke sieht das als weiteren Beweis für die Wechselwirkung der 6β-Substituenten mit der C19-Methylgruppe an. Totty und Hudec[40] finden, daß die Substitution der C19-Methylgruppe durch ein axiales H-Atom mit einem negativen Inkrement der molaren Elliptizität verbunden ist, unabhängig vom 6β-Substituenten. Wenn diese 19-nor-Derivate 6β-Cl- oder 6β-Br-Substituenten haben, findet Vorzeichenumkehr statt. Aus diesen beiden Tatsachen schließen die Autoren, daß die beiden axialen Substituenten an C10 und C6 unabhängig voneinander an den Enonchromophor gekoppelt sind. Das bedeutet aber, daß zumindest keine direkte Wechselwirkung eines 6β-Substituenten mit der C19-Methylgruppe für das Vorzeichen des Cottoneffektes im $n \rightarrow \pi^*$- und im $\pi \rightarrow \pi^*$-Bereich verantwortlich sein kann.

Nach Burgstahler und Barkhurst[41] wird der $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang der K-Bande durch den Chiralitätsbeitrag der α'-pseudoaxialen Bindung bestimmt (s.u.). Diese Regeln wenden Hudec und Mitarb.[40] auch auf den $n \rightarrow \pi^*$-Übergang an. Das bedeutet, daß auch der Cottoneffekt dieses Übergangs durch den 6β-Substituenten und seine relative Orientierung zu H2β bestimmt wird.

Das unterschiedliche Verhalten der zwei verschiedenen Gruppen von 6β-Substituenten auf das Vorzeichen $n \rightarrow \pi^*$-Über-

gangs führen diese Autoren bei der ersten Gruppe (CH_3, Cl, Br, J, S-Acetyl) auf ein starkes, bei der zweiten Gruppe (F, OH, O-Acetyl) auf ein schwaches Quadrantenverhalten bei α-axialen oder β-äquatorialen Cyclohexanonen zurück.

Nach Untersuchungen von Beecham und Collins[110] an verschiedenen 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden zeigen die n → π*-Übergänge teilweise rein negative Cottoneffekte, teilweise zeigen die Spektren einen Vorzeichenwechsel innerhalb des n → π*-Übergangs, d.h. der langwellige Teil ist positiv, der kurzwellige negativ. Mit Ausnahme der 6β-Methylderivate handelt es sich bei den untersuchten Derivaten allerdings nicht um CC-verknüpfte Substituenten. Die australischen Autoren führen die Feinstruktur des Cottoneffektes im Bereich von 390-265 nm auf zwei elektronische Übergänge, nämlich den Singulett-Triplett und den Singulett-Singulett n → π*-Übergang zurück. Sie interpretieren das negative Maximum bei 369 nm als O-O-Bande einer Oberschwingung einer Carbonylbande im Singulett-Singulett n → π*-Übergang und entsprechend die Bande bei 339 nm als die O-2-Bande. Eine schwache positive Bande bei 384 nm führen sie auf einen getrennten elektronischen Übergang, nämlich einen Singulett-Triplett-Übergang zurück.

Nach einer ausführlichen Untersuchung von verschiedenen 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden, die teilweise ganz negative, teilweise aber Cottoneffekte mit zwei verschiedenen Vorzeichen zeigen, kommen die Autoren zu dem Schluß, daß die Ursache des Vorzeichenwechsels unklar ist, und daß in beiden Fällen nur ein gut definierter Schwingungsübergang vorliegt. Sie sind daher der Meinung, daß aus dem unterschiedlichen Kurvenverlauf keine Schlußfolgerungen auf die Stereochemie des Steroids zu ziehen sind.

Bei 6β-Methylcholest-4-en-3-on, gemessen in Methanol als Lösungsmittel, finden diese Autoren einen positiven Cotton-

effekt bei 339 nm und einen negativen bei 297 nm. Dieser Befund wird auch, mit Ausnahme einer geringen Intensitätsänderung, mit den unpolaren Lösungsmitteln Cyclohexan und Isopentan bestätigt. Bei früheren Untersuchungen anderer Autoren bei 6β-Methyltestosteron wird bei ORD-Messungen nur ein positiver Cottoneffekt in Methanol gefunden[131]. Bei CD-Messungen von 6β, 17α-Dimethyltestosteron wird ebenfalls nur ein positiver Cottoneffekt in Methanol gefunden[39].

Die CD-Spektren der in dieser Arbeit untersuchten 6β-CC-verknüpften 4-En-3-ketosteroide zeigen im n → π*-Bereich eine optimale Feinstruktur, wenn sie im Lösungsmittel Dioxan gemessen werden. Dioxan hat mittlere Polarität und ist ein gutes Lösungsmittel für die untersuchten Steroide. Wegen seiner niederen UV-Durchlässigkeitsgrenze sind Messungen bis in den 200 nm-Bereich möglich. Auch das noch polarere Methanol wäre aus dem gleichen Grund als Lösungsmittel gut geeignet. Es besteht aber die Gefahr, daß vor allem 6β-halogensubstituierte 4-En-3-ketosteroide mit absolutem Methanol reagieren[28]. Chloroform kann wegen seiner UV-Durchlässigkeitsgrenze von etwa 250 nm nicht für die Messungen der energiereichen π → π*-Übergänge verwendet werden. Wegen der geringen Löslichkeit der stark polaren Steroidderivate in Kohlenwasserstoffen, kommen Lösungsmittel wie Cyclohexan oder Isopentan nicht infrage. Um aber dennoch den Einfluß von polaren und unpolaren Lösungsmitteln auf den Cottoneffekt zu untersuchen, wird bei Isomerenpaar 17A und 17B der n → π*-Übergang außer in Dioxan noch in Methanol und Chloroform gemessen. Die Konzentration der Steroidderivate beträgt bei allen CD-Messungen $0.25 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Diese verhältnismäßig hohe Konzentration wird gewählt, weil das verwendete Gerät ein starkes Rauschen aufweist, sodaß bei hohen Verdünnungen ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis auftritt, sodaß eine exakte Auswertung nicht mehr möglich ist. Auch die Messung von verdünnten Lösungen bei großer Schichtdicke der Küvette ist aus appara-

tiven Gründen nicht möglich. Die Ergebnisse der CD-Messungen sind aus den Abbildungen 44 und 48-52 und den Tabellen 36-38 ersichtlich.

In Dioxan als Lösungsmittel zeigen die untersuchten Derivate vier bis fünf deutlich ausgeprägte Maxima und oft noch zwei zusätzliche Maxima geringerer Intensität. Dieses Verhalten stimmt im wesentlichen mit den Ergebnissen in unpolaren Lösungsmitteln der australischen Gruppe überein. Das intensivste Maximum ist um 27.5 - 29.5 nm gegenüber den intensivsten Maximum des unsubstituierten Ausgangssteroids bathochrom verschoben. Während die 6β-Brom-4-en-3-ketosteroide den erwarteten Vorzeichenwechsel vom negativen zum positiven Cottoneffekt ohne Feinstruktur zeigen, verhalten sich die CC-verknüpften 6β-Derivate unterschiedlich. Bei einigen Derivaten findet ein vollständiger Vorzeichenwechsel des Cottoneffektes von minus nach plus statt. Bei anderen Derivaten ist die $n \rightarrow \pi^*$-Bande in einen negativen kürzerwelligen und einen positiven längerwelligen Bereich aufgeteilt. Im angelsächsischen Sprachgebrauch wird die Form dieser Kurve mit "bisignate" bezeichnet, d.h. nur der längerwellige Teil hat das Vorzeichen gewechselt. Vom Isomerenpaar 17A/17B hat 17A einen vollständigen Vorzeichenwechsel, 17B zeigt "bisignate"-Verhalten. Die Spektren beider Isomeren zeigen fünf Maxima bei gleichen Wellenlängen. Bei 17A sind die langwelligen Maxima am intensivsten. Der Null-Durchgang von 17B liegt bei 357.5 nm; d.h. zwei Maxima (380 und 362 nm) haben positives Vorzeichen, drei Maxima negatives (347.5; 332.5 und 318 nm). Die beiden zuletzt genannten Maxima sind am intensivsten. Wie Abb. 52 und Tab. 38 und 39 zeigen, ist bei 17A das Maximum in Chloroform um 6 nm in den kurzwelligen Teil verschoben, im Vergleich zum intensivsten Maximum in Dioxan. In Methanol liegt das Maximum bei 345 nm und entspricht damit dem Maximum in Dioxan mit der zweithöchsten Intensität. Bei 17B ist in Chloroform das Maximum gegenüber Dioxan um 8 nm in den längerwelligen

Bereich verschoben (von 360 nach 368 nm). Außerdem ist das negative Maximum ebenfalls geringfügig verschoben (von 318 nach 322 nm). In Methanol sind die Verschiebungen gegenüber Dioxan noch geringer.

Auf der Suche nach einer Erklärung für das unterschiedliche CD-Verhalten von 17A und 17B liegt es nahe, die ebenfalls stark verschiedenen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten des Isomerenpaares mit den CD-Daten in Beziehung zu bringen. Bei allen untersuchten 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden fällt auf, daß die chemischen Verschiebungen von H19 und C19 stark

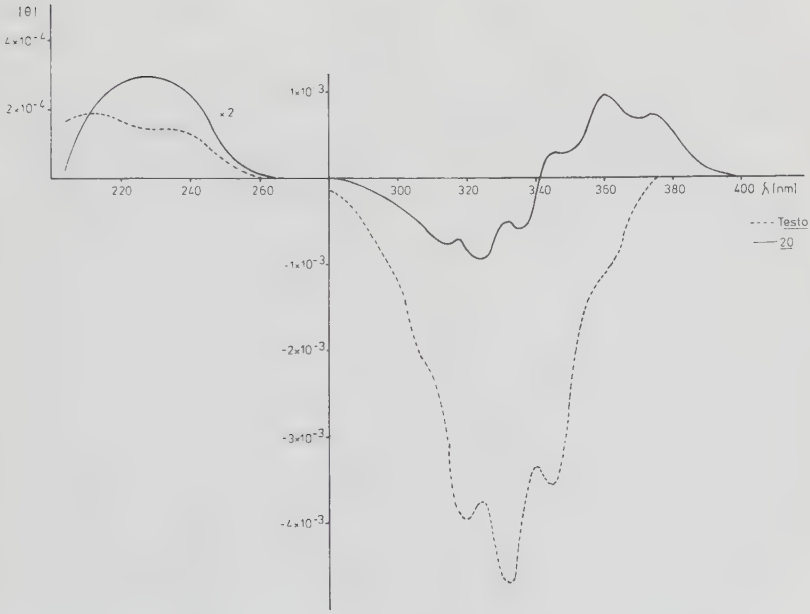


Abb. 49: CD-Spektren von Testosteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 20 und von Testosteron in Dioxan

substituentenabhängig sind. Man kann daher die ursprüngliche Interpretation einer direkten Wechselwirkung des 6β-Substituenten mit der C19-Methylgruppe aufgreifen und die C19-Inrekmente mit den Vorzeichen des Cottoneffektes in Beziehung setzen. Das erscheint gerechtgertigt, selbst wenn

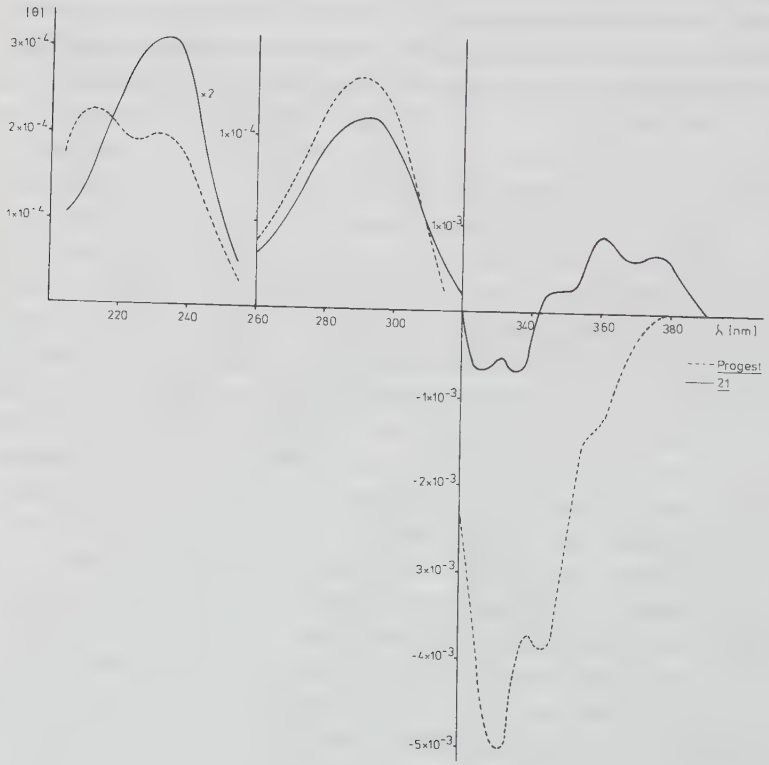


Abb. 50: CD-Spektren von Progesteron-6β-yl-malonsäuredimethylester 21 und von Progesteron in Dioxan

die spätere Theorie zeigt, daß keine direkt gekoppelte Wechselwirkung dieser beiden axialen Substituenten auf das 3-On-4-en-System vorliegt. So kann doch als Folge einer rein elektronischen Wechselwirkung des 6β-Substituenten mit dem Enonchromophor der A-Ring so verzerrt werden, daß H19 bzw. C19 eine mehr oder weniger starke Tieffeldverschiebung erfahren. Dabei kann, aber muß nicht, die in der Theorie geforderte relative Orientierung des 6β-Substituenten mit H2β eine Rolle spielen. Für eine indirekte Beeinflußung der C19-Methylgruppe spricht, daß man bei einer direkten Wechselwirkung eigentlich eine Hochfeldverschiebung von H19 bzw. C19 erwarten müßte, wie sie oben bei der Diskussion der 17α-17β-Isomeren 19/1 und 19/2 erklärt wird.

So ist, wie oben dargelegt, bei 17A H19 nur geringfügig tieffeldverschoben, die Konformation des A-Ringes aber so verändert, daß ein vollständiger Vorzeichenwechsel des Cottoneffektes resultiert. Bei 17B ist H19 nicht tieffeldverschoben, obwohl der Substituent ebenfalls 6β-ständig ist. C19 ist bei 17B wesentlich weniger tieffeldverschoben als bei 17A. Im CD des $n \rightarrow \pi^*$-Übergangs findet nur ein teilweiser Vorzeichenwechsel statt. Auch bei den anderen untersuchten 6β-substituierten Steroidderivaten läßt sich prüfen, ob eine solche Beziehung vorliegt. Als quantitatives Maß sind die C19-Tieffeldverschiebungsinkremente anzusehen; sie sind empfindlicher als die H19-Inkremente. Wie aus den CD-Tabellen und der ^{13}C-Inkrementtabelle ersichtlich ist, muß zum vollständigen Vorzeichenwechsel des Cottoneffektes offensichtlich das C19-Inkrement zwischen +3.2 und +3.6 ppm liegen. Bei 17A, 18/1, 18/2, 19/1, 19/2 und den 6β-Bromderivaten 1 und 4 sind die C19-Inkremente +3.2 ppm oder größer und damit der Cottoneffekt mit allen Maxima vollständig positiv. Bei 17B mit einem C19-Inkrement von +2.2 ppm ist das Maximum bei 347.5 nm noch negativ. Bei den Malonesterderivaten 20 und 21, die ebenfalls "bisignate"-Verhalten zeigen, betragen die C19-Inkremente jeweils

+2.8 ppm; die Maxima bei 245 bzw. 247 nm sind dann aber schon positiv, während die Maxima bei 331 und 317.5 nm noch negativ sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein starker indirekter oder direkter Einfluß des Substituenten auf die C19-Methylgruppe einen Vorzeichenwechsel aller Banden des n → π^*-Übergangs bewirkt, eine schwächerer nur der O-O- und O-1-Bande, ein ganz schwacher nur der O-O-Bande.
Die Grenze zwischen den beiden letzten Vorzeichenänderungen liegt bei 2.8 ppm Tieffeldverschiebung der C19-Inkremente.

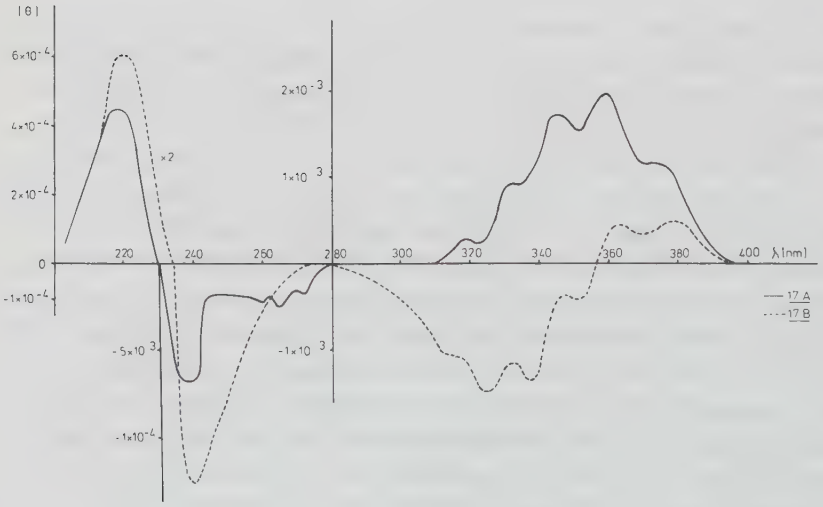


Abb. 51: CD-Spektren von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A und dem Stereoisomeren 17B in Dioxan

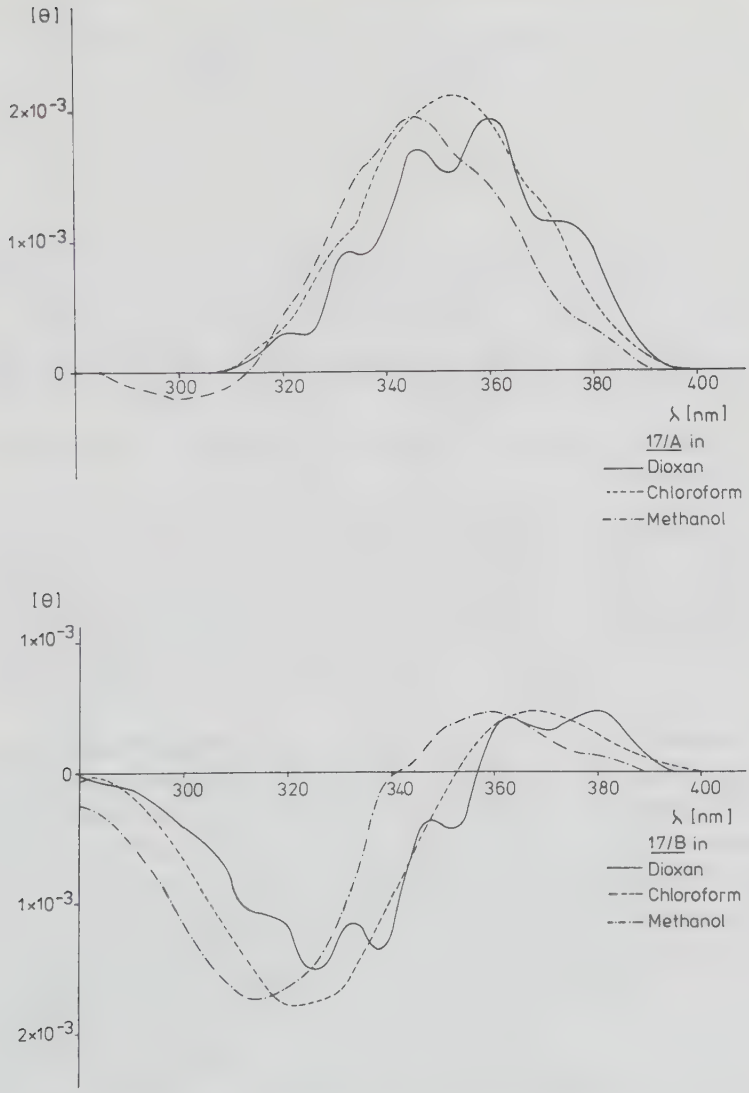


Abb. 52: CD-Spektren im Bereich des n → π^*-Übergangs von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A und dem Stereoisomeren 17B in Chloroform, Dioxan und Methanol

2.10.2. Der $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang[126)]

Der CD von α, β-ungesättigten Ketonen im Bereich des UV-Maximums kann nach zwei Regeln erklärt werden.

Einmal kann die Helizitätsregel von cisoiden Dienen auf die K-Bande von α, β-ungesättigten Ketonen angewandt werden, wenn man die C=C-C=O-Gruppierung als inhärenten dissymmetrischen Chromophor betrachtet. Berechnungen unter Verwendung von einfachen Wellenfunktionen nach dem Hückeltyp liefern folgendes Ergebnis: Cisoide und transoide Konfigurationen, bei denen der Torsionswinkel zwischen der Carbonylgruppe und der Doppelbindung positiv ist, sind mit einem positiven Cottoneffekt der K-Bande verbunden. Bei der spiegelbildlichen Anordnung wird ein negativer Cottoneffekt erwartet.

Zum anderen kann das Vorzeichen des Cottoneffektes von α, β-ungesättigten Ketonen durch die sogenannte allylische axiale Regel von Burgstahler und Barkhurst[41)] erklärt werden. Nach dieser Regel sind asymmetrische Störungen der Doppelbindungskomponente des Chromophors durch Wechselwirkungen im angeregten Zustand mit ihren allylischen axialen oder pseudoaxialen Bindungen entscheidend für das Vorzeichen des Cottoneffektes, aber nicht unbedingt für seine Intensität. Wendet man diese Regel auf cyclische konjugierte Enone an, bedeutet das, daß das Vorzeichen im Bereich des UV-Maximums bei 230-260 nm durch allylische axiale Störungen der CC-Doppelbindung bestimmt wird. Bei vielen 4-En-3-ketosteroiden wird also der Cottoneffekt ausschließlich durch den axialen Substituenten am γ-C-Atom, bezogen auf das Carbonyl-C-Atom, also den 6β-Substituenten und dessen relative Orientierung zum axialen H-Atom am α'-C-Atom also H2β bestimmt.

Bei allen in der Publikation von Totty und Hudec[40)] aufgeführten 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden führt das

zu einer Vorzeichenumkehr und damit zu einem negativen Cottoneffekt der K-Bande; während wie oben ausgeführt, das Vorzeichen der R-Bande (n → π^*-Übergang) nur von einer von zwei Gruppen von 6β-Substituenten, nämlich der Gruppe mit CH_3 und den Halogenen geändert wird. Bei dieser Gruppe sind dann die Vorzeichen von K- und R-Bande gerade umgekehrt: K-Bande negativ, R-Bande positiv.

Für den π → π^*-Übergang gilt, ebenso wie für den n → π^*-Übergang, daß äquatoriale 6α-Substituenten das Vorzeichen des Cottoneffektes genau so wenig ändern wie 4-En-3-ketosteroide, bei denen die C19-Methylgruppe durch ein axiales H-Atom ersetzt ist.

Der Cottoneffekt des energiereicheren Übergangs im Bereich von 200-220 nm wird durch den Chiralitätsbeitrag der pseudoaxialen Bindung am α'-C-Atom, also H2β, in Wechselwirkung zur Carbonylgruppe bestimmt. Bei 4-En-3-ketosteroiden hat der α'-Chiralitätsbeitrag positives Vorzeichen; der beobachtete Cottoneffekt ist ebenfalls positiv. Ein 6β-Substituent hat keinen Einfluß auf das Vorzeichen dieses Cottoneffektes.

Zur Wechselwirkung 6β-H2β ist anzumerken, daß bei allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten 6β-substituierten Derivaten C2 im ^{13}C-NMR-Spektrum seine chemische Verschiebung nicht ändert. Bei den hier nach Literaturangaben von Holland und Thomas[36] betroffenen Zuordnungen werden C1 und C19 tieffeld- und C8 hochfeldverschoben. Bei einer Wechselwirkung des 6β-Substituenten mit H2β würde man eine Hochfeldverschiebung von C2 erwarten.

Im folgenden soll diskutiert werden, ob die Vorzeichenregeln für den π → π^*-Übergang auch für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten 6β-CC-verknüpften 4-En-3-ketosteroide gelten.

Bei 17A beträgt der durch Röntgenstrukturanalyse (s.u.) bestimmte Torsionswinkel O3-C3-C4-C5 -174.3^{o}; bei Testosteron beträgt er bei der Kristallmodifikation T1 $+179.1^{o}$ bei T2 -176.6^{o}. Nach der Helizitätsregel muß demnach der Cotton-effekt der K-Bande negatives Vorzeichen haben, das trifft hier auch zu.

Nach der allylischen axialen Regel müßten alle untersuchten Derivate negative Cottoneffekte der K-Bande aufweisen, das ist aber offensichtlich nicht der Fall. Nur die Isomeren 17A und 17B mit dem 6β-Phenylsulfonylessigsäuremethylester-substituenten haben in allen untersuchten Lösungsmitteln einen negativen Cottoneffekt. Bei den Malonsäuremethylester-derivaten liegt ein positiver Cottoneffekt bei 235 nm mit großer Intensität vor. Bei den Methylsulfonylessigsäure-methylesterderivaten 18/1, 18/2, 19/1 und 19/2 sind in den CD-Spektren zunächst keine K-Banden zu sehen. Entweder sind die Maxima kurzwellig verschoben und fallen mit den Maxima des energiereicheren Übergangs bei 220-225 nm zusammen, oder, was wahrscheinlicher ist, die Maxima der K-Bande überlappen mit dem Anstieg zum Maximum des energiereicheren Übergangs und liegen dann an der erwarteten Stelle im Bereich des UV-Maximums bei 236 nm. Da die UV-Maxima mit den erwarteten Molextinktionen vorhanden sind, sollte auch der entsprechende Übergang im CD-Spektrum vorhanden sein. In der Tab. 37 sind die molaren Elliptizitäten daher bei der Wellenlänge der UV-Maxima in Klammern angegeben. In beiden diskutierten Fällen ist der Cottoneffekt positiv.

Bei den ^{13}C-Inkrementen lassen sich keine Anhaltspunkte für die unterschiedlichen Cottoneffekte der K-Bande bei 17A und 17B einerseits und den Methylsulfonylessigsäuremethylester- und den Malonsäuredimethylesterderivaten andererseits finden. Das Abweichen des Vorzeichens des Cottoneffektes von der Regel kann somit noch nicht erklärt werden.

Tab. 36: Maxima und Molextinktion aus den UV-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der 6β-Malonsäuremethylesterderivaten von Testosteron 20 und von Progesteron 21

MMT 20				MMP 21			
UV		CD		UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]
		375	+ 740			376	+ 690
		361	+ 960			361	+ 900
		345	+ 290			347	+ 260
		342	± 0			342.5	± 0
		331	- 510			331	- 580
		317.5	- 680				
						290	+10850
236	15000	235	+29700	236	14800	235	+31020
		215	+23700			225	+28380

Testo				Prog			
UV		CD		UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]
		360	- 1100			360	- 1320
		346	- 3560			344	- 3860
		332.5	- 4690			332	- 4990
		319	- 3960			322	- 2280
		307.5	- 2310			316	± 0
						290	+13330
235	16800	235	+28380	236	17000	332	+39600
		211	+37000			212	+44900

Tab. 37: Maxima und Molextinktion aus den UV-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der 6β-substituierten Testosteron- bzw. Progesteronderivate 18/1, 18/2, 19/1 und 19/2

MSET/1 18/1				MSET/2 18/2			
	UV	CD			UV	CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
		375	+ 1120			375	+ 1120
		360	+ 1910			360	+ 1850
		345	+ 1580			347.5	+ 1520
		330	+ 660			335	+ 630
		300	+10100				
233	15400	(235)	(+36300)	235	16400	(235)	(+21000)
		225	+52800			220	+40920

MSEP/1 19/1				MSEP/2 19/2			
	UV	CD			UV	CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
		377	+ 1080			379	+ 1030
		361	+ 1820			361	+ 1740
		346	+ 1560			347	+ 1400
		335	+ 820			332.5	+ 610
		290	- 6530			292	+ 9340
235	14200	(235)	(+23750)	235	14200	(235)	(+29700)
		222	+29690			222	+41580

Tab. 38: Maxima und Molextinktion aus den UV-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der 6β-substituierten Testosteronderivate 17A und 17B, gemessen in Dioxan, Chloroform und Methanol

PSET/A 17A (Dioxan)				PSET/B 17B (Dioxan)			
	UV	CD			UV	CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]
		375	+ 1140				
						379	+ 410
		360	+ 1950			362	+ 420
						357.5	± 0
		346	+ 1690			347.5	- 370
		332	+ 920			332.5	- 1160
		319	+ 290			318	- 1080
		307.5	+ 50				
236	16400	235	- 9240	236	13000	237	-15840
		217.5	+88400	228	13400	321	+121400

PSET/A 17A ($CHCl_3$)				PSET/B 17B ($CHCl_3$)			
	UV	CD			UV	CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[Θ]
						368	+ 450
		354	+ 2110			353	± 0
						322	- 1800
		235	-19800			240	- 9500

Fortsetzung der Tabelle 38

PSET/A 17A (MeOH)				PSET/B 17B (MeOH)			
	UV	CD			UV	CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
						360	+ 460
		345	+ 1950			344	± 0
		313.5	± 0			315	- 1740
		302	- 211				
236	17000	235	-15180	241	14200	255	- 1780
223	19500	220	+81840	222	17000	222.5	+109560

2.11. Die 4,6-Dien-3-ketosteroide als Nebenprodukte bei der allylischen Alkylierung

Bei allen allylischen Alkylierungen tritt als Nebenprodukt das 4,6-Dien-3-ketosteroid, hier also Dehydrotestosteron bzw. Dehydroprogesteron, in wechselnden Mengen auf. Darüber berichteten schon Collins et al.[14] in ihrer ersten Kurzmitteilung zur Synthese der 6β-Malonesterderivate von 4-En-3-ketosteroiden, ohne dabei den Grund für die Einführung der zusätzlichen C6-C7-Doppelbindung in das Steroidgerüst zu erklären.

Nach Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wird das Dienon dann gebildet, wenn im Reaktionsansatz noch überschüssiges Natriumhydrid vorhanden ist, das nicht zuvor mit dem CH-aciden Ester unter Salzbildung reagiert hat. Die Base Natriumhydrid reagiert dann mit dem π-Allylpalladiumhalogenkomplex des 4-En-3-ketosteroids nach unbekanntem Mechanismus

zum 4,6-Dienon. Bei der Chromatographie der aufgearbeiteten Reaktionsansätze auf Kieselgelfertigsäulen wird Dehydrotestosteron 27 gleich nach Testosteron aber vor den polaren Alkylierungsprodukten eluiert (s. Abb. 37). Oft ist es noch mit Testosteron und anderen Nebenprodukten verunreinigt. Das Massenspektrum von Dehydrotestosteron 27 ist mit dem aus der Literatur bekannten fast identisch[132]. Es zeigt die für die 4,6-Dien-3-on-Gruppierung charakteristischen Fragmente mit den Massen 136 ($C_9H_{12}O$) und 151. Im UV-Spektrum von 27, gemessen in Dioxan, liegt das Maximum bei 277 nm; die Molextinktion beträgt 19400.

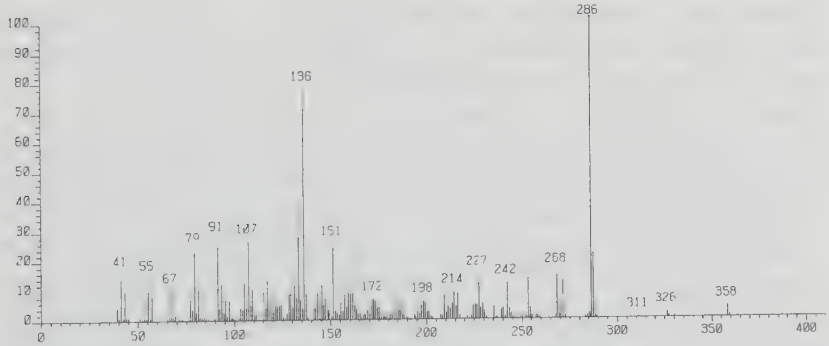


Abb. 53: Massenspektrum von Dehydrotestosteron 27 (M = 286); Elektronenenergie 70 eV; Ionenquelle-Temperatur 200°C

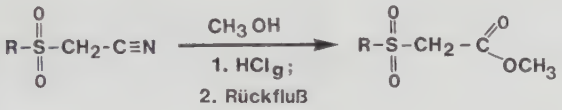
Die Dienonbildung stellt insofern eine interessante Funktionalisierung dar, als die zusätzliche Doppelbindung wegen des starken Elektronenzugs der 3-On-4-engruppierung leicht Nukleophile an C7 addieren kann. So konnten, wie schon oben

erwähnt, Lindner et al.[10] durch Reaktion mit dem Dianion der Mercaptopropionsäure die 7α-Thioethercarbonsäuren von 4-En-3-ketosteroiden darstellen. Der klassische Weg zu den Dienonen führt über die β-Eliminierung von Bromwasserstoff aus den 6β-Brom-4-en-3-ketosteroiden durch Erhitzen mit der Base 2,4,6-Collidin[133]. Die Ausbeute an Olefin ist allerdings gering, da ein großer Teil des Steroids beim Erhitzen unter basischen Bedingungen zerstört wird.

Es wäre daher wünschenswert, eine schonende Methode zu ihrer Darstellung zu entwickeln. Behandelt man den Testosteronkomplex mit dem vierfachen molaren Überschuß von Natriumhydrid in DMSO bei Raumtemperatur, so entstehen schon nach kurzer Zeit Testosteron und Dehydrotestosteron im Reaktionsansatz etwa im Verhältnis 1:1. Leider verschiebt ein größerer molarer Überschuß von Natriumhydrid das Verhältnis nicht zugunsten des Dienons, eher zugunsten des Testosterons. Der Weg zur Optimierung der Reaktion liegt wahrscheinlich bei der Verwendung von geeigneteren Basen. Versuche in dieser Richtung sind von der australischen Arbeitsgruppe unternommen worden[134]. Diese Autoren behandeln den Komplex mit verschieden starken Basen und variieren dabei noch Lösungsmittel, Temperatur und Reaktionszeit. Sie finden, daß starke Basen zwar die Dienonbildung begünstigen, daß es aber schwierig ist, die Dienone nach chromatographischer Abtrennung vom restlichen Komplex zu kristallisieren. Bei Verwendung von milden Basen auch in hohen Konzentrationen ist der Reaktionsumsatz gering, aber die Dienone können nach Chromatographie der Ansätze leicht kristallisiert werden.

2.12. Die Synthese der CH-aciden Ester Phenylsulfonylessigsäuremethylester und Methylsulfonylessigsäuremethylester

2.12.1. Verschiedene Synthesewege

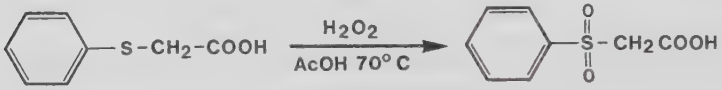


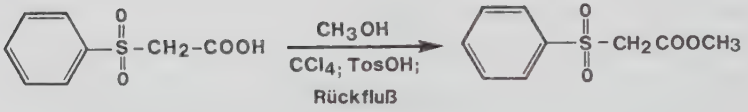
R = C_6H_5

R = CH_3

Die von Trost und Mitarbeitern[102] mit großem Erfolg zur allylischen Alkylierung von π-Allylpalladiumchloridkomplexen von einfachen Olefinen eingesetzten CH-aciden Verbindungen Phenyl- und Methylsulfonylessigsäuremethylester können nach einer eleganten Methode aus den entsprechenden Nitrilen synthetisiert werden. Analog nach einer Vorschrift von Cope und Fenton[135] löst man Phenyl- bzw. Methylsulfonylacetonitril in einem großen Überschuß von Methanol und gibt die zum Nitril äquimolare Menge Wasser hinzu und leitet dann trockenen Chlorwasserstoff ein. Nach Kochen unter Rückfluß bildet sich dann der Methylester unter Abscheidung von Ammoniumchlorid. Wahrscheinlich wird als Zwischenstufe das entsprechende Imidoesterhydrochlorid gebildet. Nach Angabe der Autoren mißlingt die Reaktion, wenn kein Wasser zum Reaktionsansatz hinzugefügt wird; in diesem Fall wird das Nitril unverändert zurückgewonnen. Die Reaktion wird von den genannten Autoren zur Synthese des Ethylesters der 1,2,5,6-Dibenz-1,3,5,7-cyclooctatetraen-3,8-dicarbonsäure eingesetzt. Andererseits ist aus der Literatur[136] bekannt,

daß nach der Reaktion von Vanillinnitril in absolutem Ether mit einem geringen molaren Überschuß von Ethanol und Einleiten von Chlorwasserstoff Vanillinimidoethylesterhydrochlorid isoliert werden kann. Dieses wird dann durch Kochen mit Wasser in den Ethylester umgewandelt.





Ein anderer Weg zum Phenylsulfonylsäuremethylester geht von Phenylmercaptoessigsäure aus. Diese wird nach Pasto et al.[137,138] mit Peressigsäure zur Phenylsulfonylessigsäure oxidiert, die dann nach der Methode der extraktiven Veresterung mit Methanol und Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel unter Verwendung von 4-Toluolsulfonsäure als Katalysator in den Methylester überführt wird[139]. Bei der Oxidation des Thioethers zum Sulfon ist darauf zu achten, daß sich aus Wasserstoffperoxid und Eisessig durch Erwärmen des Ansatzes auf 70-80°C zuerst Peressigsäure bildet, da sonst nur zur Sulfoxidstufe oxidiert wird.

Tab. 39: Die ^{1}H- und ^{13}C-chemischen Verschiebungen der zur allylischen Alkylierung eingesetzten CH-aciden Ester

^{1}H-NMR: H-Atome	Malonsäuredimethylester	Methylsulfonylessigsäuremethylester	Phenylsulfonylessigsäuremethylester
CH_2	3.29	3.98	4.11
CH_3(Ester)	3.64	3.81	3.68
$CH_3(SO_2)$		3.13	
Phenylrest			7.45 - 7.99
^{13}C-NMR: C-Atome			
C = O	166.7	163.3	162.7
CH_2	40.9	58.8	60.7
CH_3(Ester)	52.3	53.2	52.9
$CH_3(SO_2)$		41.6	
Phenylrest			
1 = e			138.7
2,6 = f,f'			128.3
3,5 = g,g'			129.2
4 = h			134.2

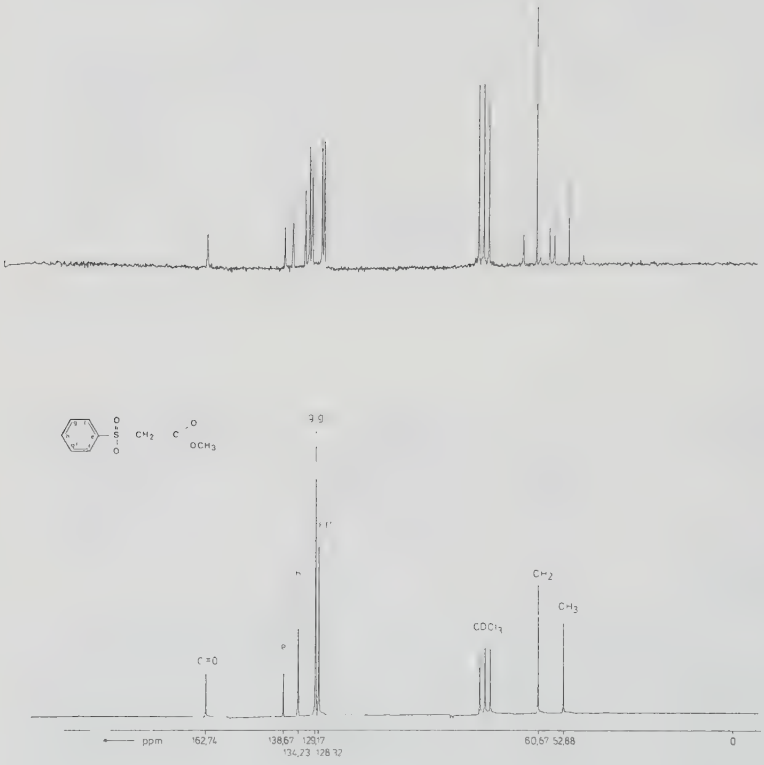


Abb. 54: ^{13}C-NMR-Spektren (20.115 MHz) von Phenylsulfonylessigsäuremethylester ca. 150 mg in 1ml $CDCl_3$.
Oben: Off-resonance-Spektrum (14084 Pulsinterferogramme); Singuletts für quartäre, Dubletts für tertiäre, Tripletts für sekundäre, Quartetts für primäre C-Atome.
Unten: protonenbreitbandentkoppeltes Spektrum (10879 Pulsinterferogramme)

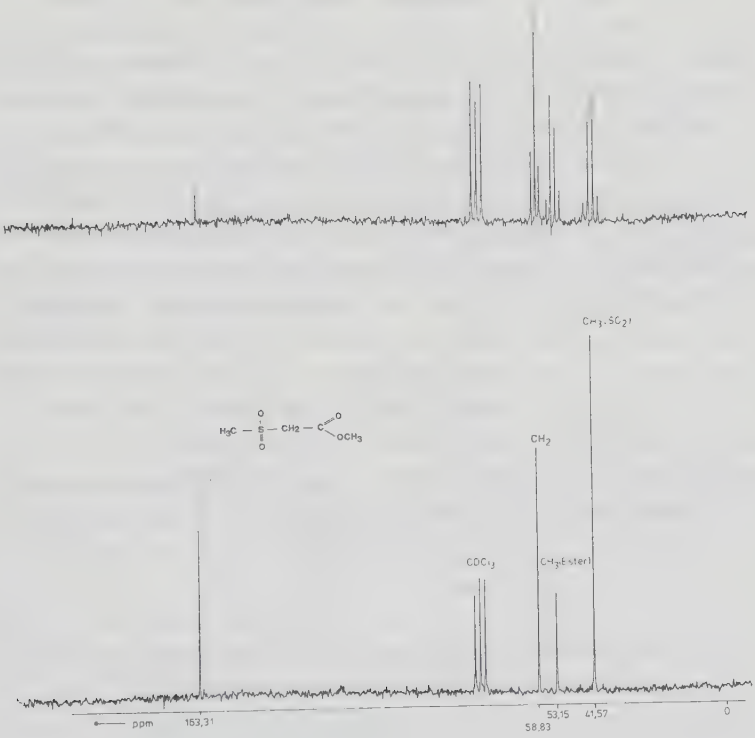


Abb. 55: ^{13}C-NMR-Spektren (20.115 MHz) von Methylsulfonylessigsäuremethylester ca. 150 mg in 1ml $CDCl_3$.
Oben: Off-resonance-Spektrum (4867 Pulsinterferogramme)
Unten: Protonenbreitbandentkoppeltes Spektrum (4201 Pulsinterferogramme)

2.12.2. Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren

Die synthetisierten CH-aciden Ester werden durch die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren charakterisiert. Bei den ^{13}C-NMR-Spektren erfolgt die Zuordnung nach den Off-Resonance-Spektren (siehe Abb. 54 und 55). Die Daten werden in Tab. 39 mit denen von Malonsäuredimethylester verglichen. Interessant ist der jeweilige Einfluß der elektronenziehenden Gruppe (-I-Effekt) auf die Signale der aciden CH-Gruppen und die Signale der Estergruppen in den ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren. Mit steigendem -I-Effekt von der Methylester- über die Methylsulfonyl- zur Phenylsulfonylgruppe wird die Elektronendichte am C-Atom der aciden CH-Gruppe geringer (Entschirmung), das führt zu größeren Werten der chemischen Verschiebung (Tieffeldverschiebung). Als Folge davon wird das Estercarbonyl-C-Atom stärker abgeschirmt, das führt zu einer Hochfeldverschiebung der ^{13}C-NMR-Signale. Die Estermethylgruppe zeigt nicht diesen Gang. Sie hat beim Methylsulfonylderivat die größte, beim Malonsäuredimethylester die kleinste chemische Verschiebung.

2.13. Die Röntgenstrukturanalyse von Testosteron-6β-yl-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A[140)]

Verschiedene spektroskopische Daten lassen die Frage offen, ob die Substituenten in den allylisch alkylierten 4-En-3-ketosteroiden wirklich axial oberhalb der Steroidebene orientiert sind: So übt z.B. der Substituent in 17B keine 1,3-diaxiale Wechselwirkung auf die C19-Methylgruppe aus, wie es von 6β-Substituenten zu erwarten wäre. Das Erscheinen von H4 als Singulett spricht aber für eine 6β-Substitution (s.o.). Durch die Röntgenstrukturanalyse soll daher die Absolutkonfiguration am Asymmetriezentrum C20 (= C-a) und die räumliche Lage der Methylestergruppe und des Phenyl-

sulfonylrestes in bezug zum Steroidgerüst ermittelt werden. Nach Duax et al.[97] sind auch Auswirkungen der 6β-Substitution auf die Konformation des Steroidgerüsts, besonders auf die des A- und B-Ringes zu erwarten.

Die Röntgenstruktur von 17A soll daher als Bezugsparameter in die Diskussion der spektroskopischen Daten von 17A und 17B mit einbezogen werden, da sich 17B trotz vieler Versuche bisher noch nicht kristallisieren läßt und daher noch keine Röntgenstrukturanalyse möglich ist. Dabei muß natürlich beachtet werden, daß Röntgenstrukturdaten am Kristall ermittelt werden und die spektroskopischen Untersuchungen, mit Ausnahme der IR-Messungen mit der gelösten Substanz durchgeführt werden.

2.13.1. Kristalldaten und Datensammlungsparameter

Die Röntgenstrukturanalyse von 17A ist von P. Hütter und W. Winter am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen ermittelt worden[92,140]. 17A kristallisiert aus Ethylacetat in farblosen Prismen. Obwohl die meisten Kristalle verzwillingt sind, wird unter dem Polarisationsmikroskop ein unverzwillingter Kristall der Größe 0.6 x 0.2 x 0.1 mm^3 gefunden, der orthorhombische Beugungssymmetrie und die für die Raumgruppe $P2_12_12_1$ typischen Auslösungen zeigt. In Tab. 40 sind die wichtigsten Kristalldaten und Datensammlungsparameter aufgeführt. In Tab. 41 sind die Bindungsabstände, in Tab. 42 die Bindungswinkel und in Tab. 43 die Torsionswinkel von 17A im Vergleich mit denen der Testosteronkonformeren T1 und T2 angegeben. Weitere technische Daten werden in der zitierten Literatur angegeben. Abb. 56 zeigt die perspektivische Darstellung der Molekülstruktur von 17A. Sie wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Tab. 40: Kristalldaten und Datensammlungsparameter

Summenformel	$C_{28}H_{36}SO_6$
Molmasse	500.66
Zellkonstanten [Å]	a = 6.229(1) b = 18.342(1) c = 25.705(3)
Elementarvolumen [$Å^3$]	2593
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Röntgenographische Dichte [g/cm^3]	1.282
Absorptionskoeffizient [mm^{-1}]	1.34
Wellenlänge der Röntgenstrahlung [Å]	1.5418 (Cu-Kα)
Meßbereich für θ [°]	3 - 70
Maximale Meßzeit [s]	60
Standardreflexe für Intensitätskontrolle	0 $\bar{7}$ $\bar{1}$, $\bar{1}$ 5 3, 0 $\bar{8}$ 0
Scan-Methode	Variable Scan-Geschwindigkeit ω / θ-Scan
Scan-Breite Δω [°]	1.0 ± 0.14 tan θ
Anzahl symmetrieunabhängiger Reflexe mit $I \geq 2$ (I)	3741
R	0.053
R_G $[\Sigma_w \Delta^2 / \Sigma F_o^2]^{0.5}$	0.056 (Einheitsgewichte)

Tab. 41: Bindungsabstände [Å] von 17A (Standardabweichungen in Klammern beziehen sich auf die letzte Ziffer)

Atome	Abstand	Atome	Abstand
S1-O11	1.444(3)	C12-C13	1.516(6)
S1-O12	1.442(3)	C13-C14	1.537(5)
S1-C20	1.827(4)	C13-C17	1.542(5)
S1-C23	1,866(5)	C13-C18	1.540(6)
C1-C2	1.513(7)	C14-C15	1.519(6)
C1-C10	1.524(6)	C15-C16	1.548(6)
C2-C3	1.484(8)	C16-C17	1.527(7)
C3-O3	1.226(6)	C17-O17	1.423(5)
C3-C4	1.449(6)	C20-C21	1.513(5)
C4-C5	1.333(6)	C21-O210	1.330(5)
C5-C6	1.516(6)	C21-O211	1.194(5)
C5-C10	1.540(5)	C22-C210	1.449(6)
C6-C7	1.537(6)	C23-C24	1.364(7)
C6-C20	1.563(6)	C23-C28	1.378(6)
C7-C8	1.532(6)	C24-C25	1.395(8)
C8-C9	1.525(5)	C25-C26	1.382(9)
C8-C14	1.521(5)	C26-C27	1.36(1)
C9-C10	1.551(5)	C27-C28	1.382(8)
C9-C11	1.543(6)	O17-H170	0.90(4)
C10-C19	1.548(6)		
C11-C12	1.542(6)		

Tab. 42: Bindungswinkel [°] von 17A (Standardabweichungen in Klammern beziehen sich auf die letzte Ziffer)

Atome	Winkel	Atome	Winkel
O11-S1-O12	119.4(2)	C11-C12-C13	111.2(3)
O11-S1-C20	107.1(2)	C12-C13-C14	108.4(3)
O11-S1-C23	107.7(2)	C12-C13-C17	117.1(3)
O12-S1-C20	107.6(2)	C14-C13-C17	98.4(3)
O12-S1-C23	109.1(2)	C12-C13-C18	110.8(3)
C23-S1-C20	105.1(2)	C14-C13-C18	112.7(3)
C2-C1-C10	115.2(4)	C17-C13-C18	109.0(3)
C1-C2-C3	111.8(4)	C8-C14-C13	113.9(3)
C2-C3-C4	117.4(4)	C8-C14-C15	119.2(3)
C2-C3-O3	120.6(4)	C13-C14-C15	104.8(3)
C4-C3-O3	121.9(4)	C14-C15-C16	103.7(3)
C3-C4-C5	124.9(4)	C15-C16-C17	105.9(3)
C4-C5-C6	118.2(4)	C13-C17-C16	104.8(3)
C4-C5-C10	121.2(4)	C13-C17-O17	116.9(4)
C6-C5-C10	120.5(3)	C16-C17-O17	113.8(4)
C5-C6-C7	110.5(3)	H170-O17-C17	105(3)
C5-C6-C20	113.4(3)	S1-C20-C6	109.1(3)
C7-C6-C20	111.4(3)	C6-C20-C21	107.5(3)
C6-C7-C8	112.2(3)	C20-C21-O210	109.8(3)
C7-C8-C9	110.1(3)	C20-C21-O211	125.3(4)
C7-C8-C14	110.1(3)	O210-C-21-O211	124.9(4)
C9-C8-C14	109.7(3)	S1-C23-C24	118.8(3)
C8-C9-C10	114.7(3)	S1-C23-C28	119.3(4)
C8-C9-C11	111.6(3)	C24-C23-C28	121.9(4)
C10-C9-C11	113.6(3)	C23-C24-C25	119.0(5)
C1-C10-C5	108.4(3)	C24-C25-C26	119.3(5)
C1-C10-C9	108.9(3)	C25-C26-C27	120.9(6)
C5-C10-C9	110.8(3)	C26-C27-C28	120.1(5)
C1-C10-C19	109.6(4)	C23-C28-C27	118.8(5)
C5-C10-C19	107.8(3)	C21-O210-C22	116.0(4)
C9-C10-C19	111.3(3)		
C9-C11-C12	113.1(4)		

Tab. 43: Torsionswinkel [°] von 17A im Vergleich mit denen der Testosteronkonformeren T1 und T2[96)]

	T1	T2	17A
Ring A			
C5-C10-C1-C2	47.8	47.3	49.7
C10-C1-C2-C3	-55.7	-54.1	-51.6
C1-C2-C3-C4	33.4	29.2	23.1
C2-C3-C4-C5	- 5.2	- 0.0	- 4.6
C3-C4-C5-C10	- 1.8	- 5.1	- 5.1
C4-C5-C10-C1	-19.6	-18.5	-21.5
Ring B			
C9-C10-C5-C6	44.9	45.0	37.4
C10-C5-C6-C7	-48.1	-50.1	-42.2
C5-C6-C7-C8	53.6	54.4	51.7
C6-C7-C8-C9	-58.7	-56.5	-59.9
C7-C8-C9-C10	57.6	54.5	55.9
C8-C9-C10-C5	-49.4	-46.8	-43.1
Ring C			
C14-C8-C9-C11	-50.1	-53.2	-52.2
C8-C9-C11-C12	49.9	52.2	52.1
C9-C11-C12-C13	-53.4	-54.4	-54.1
C11-C12-C13-C14	57.1	56.4	55.9
C12-C13-C14-C8	-61.5	-61.4	-59.8
C13-C14-C8-C9	57.6	59.7	57.6
Ring D			
C17-C13-C14-C15	46.0	45.8	47.7 ϕ_0
C13-C14-C15-C16	-32.7	-35.2	-33.1 ϕ_4
C14-C15-C16-C17	6.2	10.1	5.5 ϕ_3
C15-C16-C17-C13	22.4	18.5	23.5 ϕ_2
C16-C17-C13-C14	-41.6	-38.9	-42.4 ϕ_1

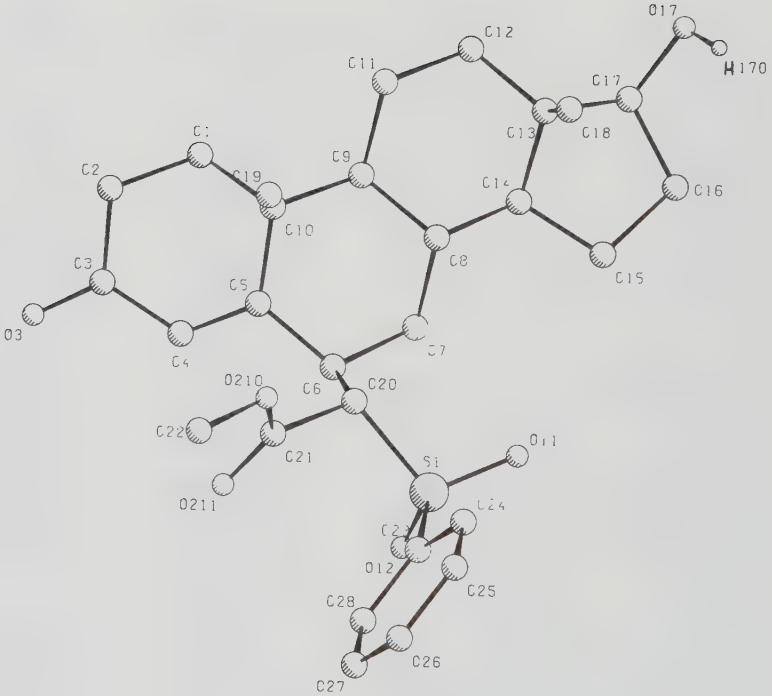


Abb. 56: Perspektivische Darstellung der Molekülstruktur von 17A

2.13.2. Die Konformation des Substituenten an C6

Die Konformation des Phenylsulfonylessigsäuremethylester-substituenten und seine Anordnung an C6 im B-Ring wird durch die entsprechenden Torsionswinkel exakt beschrieben. Sie

kann aber auch nach der Nomenklatur von Klyne und Prelog[141] qualitativ beschrieben werden. Die Bindung C6-C20 steht fast senkrecht oberhalb der Steroidebene. Das zeigen die Torsionswinkel C10-C5-C6-C20 mit +83.4° (+synclinal) und C20-C6-C7-C8 mit -75.3° (-synclinal). Im Vergleich sind dazu die entsprechenden Torsionswinkel, die die axiale Lage der C19-Methylgruppe beweisen, angegeben: C4-C5-C10-C19 mit +98.0° und C6-C5-C10-C19 mit -75.3°. Das wird auch aus der Seitenansicht des Moleküls entlang der Ebene der kleinsten Fehlerquadrate C5 bis C17 deutlich (Abb. 60). Die axiale β-ständige Lage von C20 (C-α) und damit nach Definition des ganzen Substituenten ist somit durch die Röntgenstruktur bewiesen. Bei der C6-C20 Bindung ist eine Verlängerung des Bindungsabstandes um 0.03 Å zu beobachten; sie ist eine Folge der sterischen Wechselwirkungen der Substituentenatome S1, O11 und O12 mit den Gerüstkohlenstoffatomen C6 und C7 und den beiden äquatorialen Wasserstoffatomen H6α und H7β. In Tab. 44 sind die Summen der entsprechenden Van-der-Waals-Radien[142] den beobachteten intramolekularenen Abständen gegenübergestellt. Da eine dichtere Packung offensichtlich nicht mehr möglich ist, wird die C6-C20-Bindung verlängert.

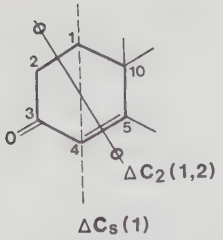
Tab. 44: Beobachtete intramolekulare Abstände $D_{beob.}$ (letzte Stelle gerundet) und Summen der Van-der-Waals-Radien Σ(VdW-R) in Å

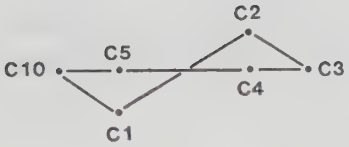
Atome	$D_{beob.}$	Σ(VdW-R)	Atome	D_{beob}	Σ(VdW-R)
S1...C7	3.23	3.55	O12...C6	2.97	3.1
S1...H72	2.69	3.05	O12...H6	2.37	2.6
O11...H72	2.38	2.6	O211...C6	3.01	3.1

Aus der Molekülstruktur oder einem danach angefertigten Molekülmodell sieht man, daß der Substituent S-Konfiguration an C20 nach der Nomenklatur von Cahn, Ingold und Prelog hat[143]. Aus der Molekülstruktur ist weiterhin ersichtlich, daß bei der Anordnung im Kristall die Estergruppe dem A-Ring sehr nahe steht, während die C21-S1-Bindung so angeordnet ist, daß der Phenylsulfonylrest relativ weit vom Steroidgerüst entfernt ist. Der Phenylrest ist andererseits der Estergruppe benachbart. Es ist eine offene Frage, ob sich diese Verhältnisse in Lösung ändern, da die C6-C20-Bindung im Prinzip frei drehbar ist. Wahrscheinlich ist aber diese Rotation durch die C19-Methylgruppe behindert. Offen ist auch, ob sich bei Drehung um die Bindungen C20-C21 oder C20-S1 oder S1-C23 die Estergruppe und der Phenylrest gegenseitig behindern; nach dem Molekülmodell wäre das immerhin möglich. Diese Fragen sind zum einen bei der Diskussion der Struktur von 17B wichtig, da sich dieses Isomere offensichtlich nur durch die räumliche Anordnung des Substituenten an C6 von 17A unterscheidet. Zum andern bestimmt die Streochemie des Substituenten die cis- oder trans-Anordnung der Carboxylgruppe nach Eliminierung und Hydrolyse (s.u.).

2.13.3. Die Konformation des A-Ringes

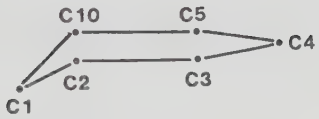
Duax und Mitarbeiter[97] haben gezeigt, daß bei den meisten 4-En-3-ketosteroiden die A-Ringe als 1α, 2β-Halbsessel- oder als 1α-Sofakonformation oder als Konformation zwischen diesen beiden Extremen vorliegt. Bei der 1α, 2β-Halbsesselkonformation sind die Atome C3, C4, C5, C10 koplanar, während C1 unterhalb und C2 oberhalb dieser Ebene liegen. Bei der 1α-Sofakonformation bilden dagegen die Atome C2, C3, C4, C5 und C10 die Ebene, C1 liegt unterhalb dieser Ebene.





1α, 2β - Halbsessel

ΔC_2 (1,2) = 0°



1α - Sofa

ΔC_s (1) = 0°

Abb. 57: Rotationsasymmetrieparameter ΔC_2 (1,2) und Spiegelasymmetrieparameter ΔC_S (1) für A-Ring-Konformationen von 4-En-3-ketosteroiden mit den zugehörenden idealen 1α, 2β-Halbsessel- bzw. 1α-Sofakonformationen

Eine ideale Halbsesselkonformation hat eine zweifache Symmetrieachse (Drehachse C_2), sie schneidet die Bindung, die die Atome außerhalb der Ebene verbindet in zwei gleiche Teile, hier also C1 und C2. Die Abweichung von der Symmetrie wird durch den Rotationsasymmetrieparameter ΔC_2 (y, z) beschrieben. Er ist wie folgt definiert:

$$\Delta C_2(x,y) = \left[\frac{\sum_{i=1} (\phi_i - \phi_i')^2}{m} \right]^{\frac{1}{2}}$$

x, y ist die von der Drehachse durchschnittene Bindung, hier also x, y = 1,2. ϕ_i und ϕ_i, sind dann die Torsionswinkelpaare C1-C2-C3-C4 und C2-C1-C10-C5 sowie C2-C3-C4-C5 und C1-C10-C5-C4. Es ist also m = 2. Bei idealer Halbsesselkonformation ist ΔC_2 (x,y) = 0°.

Die Sofakonformaticn besitzt eine Spiegelebene, die senkrecht zur Ebene des Ringes steht und durch das C-Atom, das außerhalb der Ebene liegt, hier C1, geht. Eine Abweichung von dieser Ebene wird durch den Spiegelasymmetrieparameter ΔC_S (x) beschrieben, der nach folgender Formel berechnet wird:

$$\Delta C_S(x) = \left[\frac{\sum_{i=1}^{m} (\phi_i + \phi_i')^2}{m} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Wobei x das Atom außerhalb der Ebene ist (hier ist x = 1), ϕ_i und ϕ_i, sind die symmetriebezogenen paarweisen Torsionswinkel. In diesem Fall sind es die Torsionswinkelpaare C10-C1-C2-C3 und C2-C1-C10-C5; C1-C2-C3-C4 und C1-C10-C5-C4 sowie C2-C3-C4-C5 und C10-C5-C4-C3. m ist die Anzahl der Torsionswinkelpaare; in diesem Fall ist m = 3. Wenn die Spiegelsymmetrie ideal ist, sind die paarweise zusammengehörenden Torsionswinkel von gleicher Größe und von entgegengesetztem Vorzeichen, dann ist ΔC_S (x) = 0°. Das bedeutet, daß der A-Ring eine ideale Sofakonformation hat.

Trägt man ΔC_S (1) gegen ΔC_2 (1,2) in einem Koordinatensystem auf, zeigt das Diagramm drei Bereiche. Links oben den Bereich der idealen Halbsesselkonformation, rechts unten die ideale Sofakonformation, in der Mitte den Übergang zwischen beiden Bereichen.

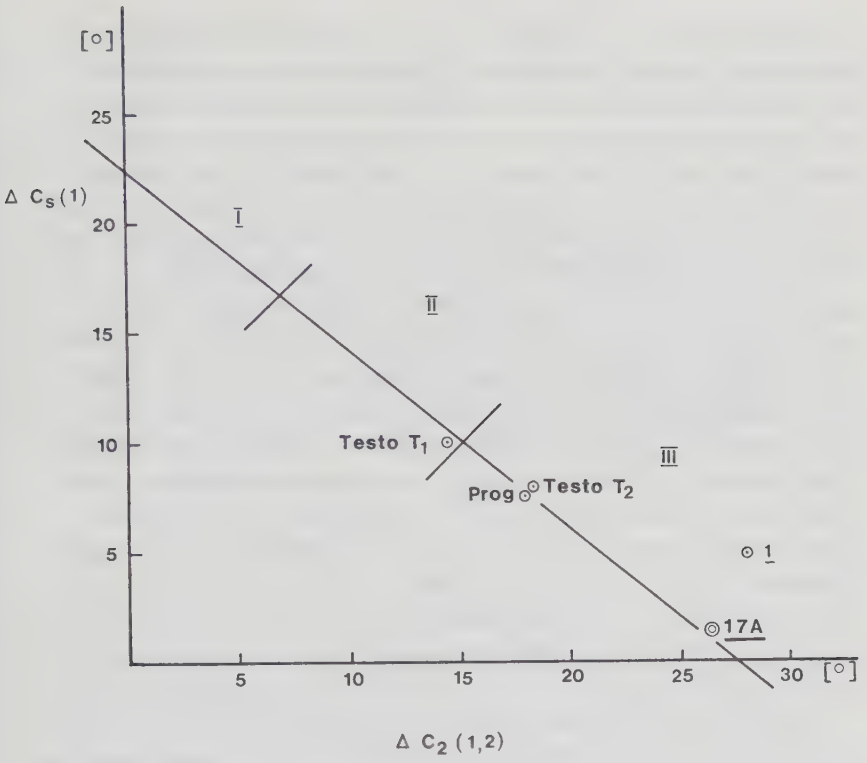


Abb. 58: A-Ring-Konformationen von 4-En-3-ketosteroiden charakterisiert durch die Koordinaten ΔC_2 (1,2)/ ΔC_S (1); Gerade gezeichnet nach Werten der Abb. 36 von Duax et al.[97].

Bereich I : Ideale 1α,2β-Halbsesselkonformation

Bereich II : Übergang von Halbsessel- zur Sofakonformation

Bereich III: Ideale 1α-Sofakonformation

Im Fall von 17A ist es von Interesse, ob die Einführung des Substituenten im B-Ring an C6 eine Konformationsänderung im A-Ring und in den anderen Ringen im Vergleich zu Testosteron

zur Folge hat. Diese Frage ist nicht ohne weiteres zu beantworten, da von Testosteron sechs symmetrieunabhängige kristallographische Strukturen bekannt sind, die sich nur in der A-Ringkonformation voneinander unterscheiden. Die beiden Extreme bilden eine 1α, 2β-Halbsessel- und eine 1α-Sofakonformation[144]. Die sechs unterschiedlichen Strukturen von Testosteron werden auf den Einfluß von Kristallpackungskräften zurückgeführt[96]. Aus den Untersuchungen von O. Kennard und ihren Mitarbeitern[96] sind die Testosteronstrukturen T1 und T2 bekannt. Sie entsprechen in etwa den beiden oben genannten extremen Konformeren. Tab. 45 zeigt A-Ring-Asymmetrieparameter dieser Strukturen im Vergleich mit denen von 17A, von Progesteron und 6β-Bromprogesteron 1. Dabei werden die Torsionswinkel des Progesterongerüsts der Arbeit von Campsteyn et al.[145], diejenigen des 6β-Bromprogesterons einer Arbeit von Gopalakrishna et al.[146] entnommen.

Tab. 45: A-Ring Asymmetrieparameter

	ΔC_S (1)	ΔC_2 (1,2)
Testo T1	10.0	14.4
Testo T2	7.9	18.3
PSET/A 17A	1.5	26.4
Prog	7.8	18.0
6βBrProg 1	4.8	28.0

Die Werte von Testosteron T2 und von Progesteron stimmen fast überein, beide liegen im oberen Bereich der 1α-Sofakonformation an der Grenze zu den Zwischenstruktren. Die beiden 6β-substituierten Derivate 17A und 1 bilden viel stärker ausgeprägtere 1α-Sofakonformationen als Testosteron

T2 und Progesteron. Das Diagramm (Abb. 58) zeigt die Lage dieser A-Ringkonformationen im Vergleich zu einer Geraden, die nach den von Duax et al.[97] ermittelten Asymmetrieparametern einer Reihe von 4-En-3-ketosteroiden gezeichnet worden ist.

Ein weiteres Kennzeichen für die 1α-Sofakonformation von 17A ist der Torsionswinkel des 4-En-3-on-Systems: O3-C3-C4-C5 mit -174.3°; der entsprechende Winkel von Testosteron T2 beträgt -176.6°, der von 17-Acetoxyprogesteron -173.9° [147]. Auch der Wert des C5-C10-C9-C8-Torsionswinkels im B-Ring mit -43.1° für 17A, im Vergleich dazu T2 -56.8° und 17-Acetoxyprogesteron -44.7°, paßt zu dieser Konformation.

2.13.4. Die Konformation des B-Ringes

Durch die 6β-Substitution kommt es zu einer signifikanten Verlängerung des C5-C10 Bindungsabstandes um 0.034 Å, das ist auch bei 6β-Bromprogesteron zu beobachten. Auch die Torsionswinkel C9-C10-C5-C6 und C10-C5-C6-C7 weichen mit 37.4 und -42.2° beträchtlich von den optimalen Torsionswinkeln einer Sesselkonformation ab. Über C5 und C10 werden diese Konformationsänderungen im B-Ring an den A-Ring weitergegeben. Die 6β-Substitution führt zu einer leichten Abflachung des B-Ringes, das wird aus dem Wellungsparameter ϕ_B ersichtlich. Bei 17A beträgt er 48.4° im Vergleich zu T2 mit 51.2°. Bei 6β-Brom-Substitution ist die Abflachung des B-Ringes stärker ausgeprägt. Der Wellungsparameter ϕ[98] ist der Mittelwert der Beträge der Torsionswinkel des betreffenden Ringes (Tab. 46). Aus der stereoskopischen Abbildung der Molekülstruktur ist ersichtlich, daß der B-Ring von 17A eine verdrillte Sesselkonformation (distorted chair) einnimmt. Das wird auch den Asymmetrieparametern ΔC_S und ΔC_2 deutlich. ΔC_S (6) zeigt bei 17A eine stärker gestörte Spiegelsymmetrie als bei T1 und T2, während die ge-

ringe Rotationsasymmetrie ΔC_2 (5,10) sich nicht ändert im Vergleich zu den Testosteronkonformeren (s. Tab. 47).

Tab. 46: Wellungsparameter Ø für die A, B, C und D-Ringe von 4-En-3-ketosteroiden

	$Ø_A$	$Ø_B$	$Ø_C$	$Ø_D$
Testo T1	27.3	52.1	54.9	29.8
Testo T2	25.7	51.2	56.2	29.7
PSET/A 17A	25.9	48.4	55.3	30.2
Prog	25.6	51.7	56.5	29.9
6βBrProg 1	26.4	45.9	57.0	29.3

Tab. 47: B-Ring Asymmetrieparameter

	ΔC_S (6) [°]	ΔC_2(5,10) [°]
Testo T1	9.8	3.0
Testo T2	8.4	2.3
PSET/A 17A	15.0	3.0
Prog	7.1	2.9
6βBrProg 1	16.8	7.5

2.13.5. Die Konformation des C-Ringes

Die Konformation des C-Ringes wird von der 6β-Substituion offensichtlich nicht mehr beeinflußt. Bei 17A liegt wie beim Ausgangssteroid eine nur leicht verdrillte Sesselkonformation vor. Ähnliche Verhältnisse sind beim System Progesteron/6β-Progesteron anzutreffen (s. Tab. 48).

Tab. 48: C-Ring-Asymmetrieparameter

	ΔC_S (11)	ΔC_2 (8,9)
Testo T1	5.1	7.9
Testo T2	2.5	7.3
PSET/A 17A	2.7	5.6
Prog	0.3	5.2
6βBrProg 1	1.6	8.2

2.13.6. Die Konformation des D-Ringes

Die Struktur des D-Ringes kann durch den Pseudorotationsphasenwinkel Δ quantitativ beschrieben werden[99]. Er wird folgendermaßen berechnet:

$$\tan \frac{\Delta}{2} = \frac{(\phi_2 + \phi_4) - (\phi_1 + \phi_3)}{3{,}0777 \cdot \phi_0}$$

Wobei mit ϕ_0 bis ϕ_4 die folgenden Torsionswinkel bezeichnet werden: C17-C13-C14-C15, C14-C13-C17-C16, C15-C16-C17-C13, C14-C15-C16-C17, C13-C14-C15-C16. Sie sind in Tab. 43 aufgeführt. Ein Δ-Wert von -36° entspricht einer 14α-Briefumschlag-, ein Wert von 0° einer 13β,14α-Halbsessel- und ein Wert von $+36^\circ$ einer 13β-Briefumschlagkonformation. Die größte Amplitude der Deformation wird durch den Torsionswinkel ϕ_{max} gemessen. Er ist wie folgt definiert:

$$\phi_{max} = \frac{\phi_0}{\cos \frac{\Delta}{2}}$$

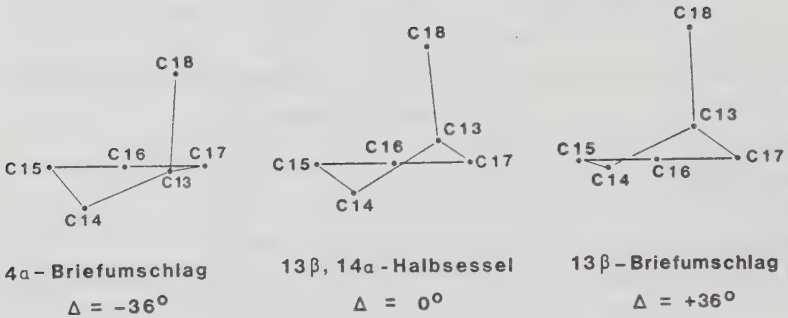


Abb. 59: D-Ring-Konformationen, definiert durch den Pseudorotationsphasenwinkel Δ

Tab. 49 zeigt Δ- und ϕ_{max}-Werte einiger 4-En-3-ketosteroide.

Tab. 49: Die D-Ring Pseudorotationsphasenwinkel Δ und maximale erreichbare Torsionswinkel während der Pseudorotation ϕ_{max}

	Δ [°]	ϕ_{max} [°]
Testo T1	20.1	46.7
Testo T2	9.8	46.0
PSET/A 17A	21.5	47.5
Prog	1.4	46.2
6βBrProg 1	11.7	45.4

Der D-Ring von 17A hat wie der von Testosteron T1 eine verdrillte 13β-Briefumschlagkonformation, der von T2 und 6β-Bromprogesteron eine verdrillte 13β,14α-Halbsessel- und der von Progesteron eine ideale 13β,14α-Halbsesselkonformation. In einem von Duax et al.[97] aufgestellten Δ/ϕ_{max}-Diagramm fallen diese Werte von Testosteron T1 und 17A in den Bereich der größten Häufigkeit. Offensichtlich reichen auch anisotrope Packungskräfte, wie unterschiedliche Wasserstoffbrückensysteme nicht aus, die Minimumenergie der D-Ringe in den Testosteronderivaten zu ändern. Damit wird hier die Vorhersage von Altona et al.[99] bestätigt, die aus 11 sehr unterschiedlichen Steroidstrukturen hergeleitet wurde. Die größte Amplitude der Deformation ϕ_{max} und die Wellungsparameter ϕ_D lassen bei den D-Ringen der aufgeführten Strukturen keine Konformationsunterschiede erkennen (Tab. 46 und 49).

2.13.7. Die Gesamtmolekülkonformation

Zur Beschreibung der Gesamtgestalt von 17A im Vergleich zu anderen Steroidstrukturen berechnet man eine Kleinste-Fehlerquadrat-Ebene durch die C-Atome C5 bis C17. Tab. 50 zeigt den Abstand der einzelnen Atome zu dieser Ebene und Abb. 60 eine Seitenansicht des Moleküls entlang dieser Ebene, aus welcher die starke Abwinkelung des A-Rings gegenüber dem Restmolekül hervorgeht.

Die Winkel, die verschiedene Kleinste-Fehlerquadrate-Ebenen zueinander einnehmen sind in Tab. 51 aufgeführt. Der Torsionswinkel der Ebenen C10-C13-C18 und C10-C13-C19 kann bei einer Blickrichtung von C10 nach C13 als Torsionswinkel C19-C10...C13-C18 aufgefaßt werden. Dieser Winkel ist zum einen ein Maß für die Gesamtverdrillung des Steroidgerüstes, zum anderen variiert dieser Winkel bei verschiedenen Strukturen bei -10 bis +12°, wobei gleichzeitig die Konformation

des A-Ringes von einer Halbsessel- zu einer Sofakonformation übergeht.

Tab. 50: Abweichungen der Atome von einer Kleinste-Fehlerquadrat-Ebene, die durch die mit * markierten Atome definiert ist (Gleichung: 0.8583 x - 0.0850 y - 0.5061 z + 4.3493 = 0; die mittlere Standardabweichung beträgt 0.006 Å)

Atom	Abstand [Å]	Atom	Abstand [Å]
C1	-0.785	C11*	0.197
C2	-0.760	C12*	-0.205
C3	-1.000	C13*	0.335
C4	-0.709	C14*	-0.158
C5*	-0.160	C15*	0.177
C6*	0.149	C16*	0.019
C7*	-0.280	C17*	-0.258
C8*	0.282	O3	-1.409
C9*	-0.209	O17	0.172
C10*	0.112	S1	1.829

Tab. 51: Torsionswinkel verschiedener Kleinste-Fehlerquadrat-Ebenen

Ebene 1	Ebene 2	Torsionswinkel [°]
A-Ring	B-Ring	160.5
B-Ring	C-Ring	177.8
C-Ring	C-Ring	174.6
A-Ring	C1 bis C17	159.3
B-Ring	C1 bis C17	179.2
C-Ring	C1 bis C17	176.2
D-Ring	C1 bis C17	176.7
C19-C10-C13	C10-C13-C18	10.9

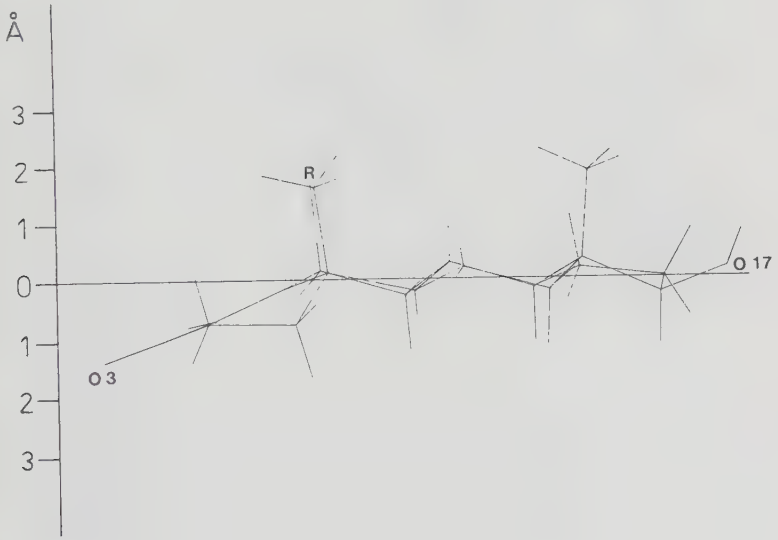


Abb. 60: Seitenansicht von 17A entlang der Ebene der Kleinsten-Fehlerquadrate C5 bis C17

2.13.8. Die Kristallstruktur von 17A

Abb. 61 zeigt die Molekülpackung in der Elementarzelle. Wie bei den meisten Androstenen bilden die Moleküle auch im vorliegenden Fall unendliche Ketten, die durch Wasserstoffbrückenbindungen helixartig zusammengehalten werden. Der Abstand von H170 zu O11 beträgt 2.23 Å, der Winkel O17-H170...O11 beträgt 158°. Außer diesem Abstand werden

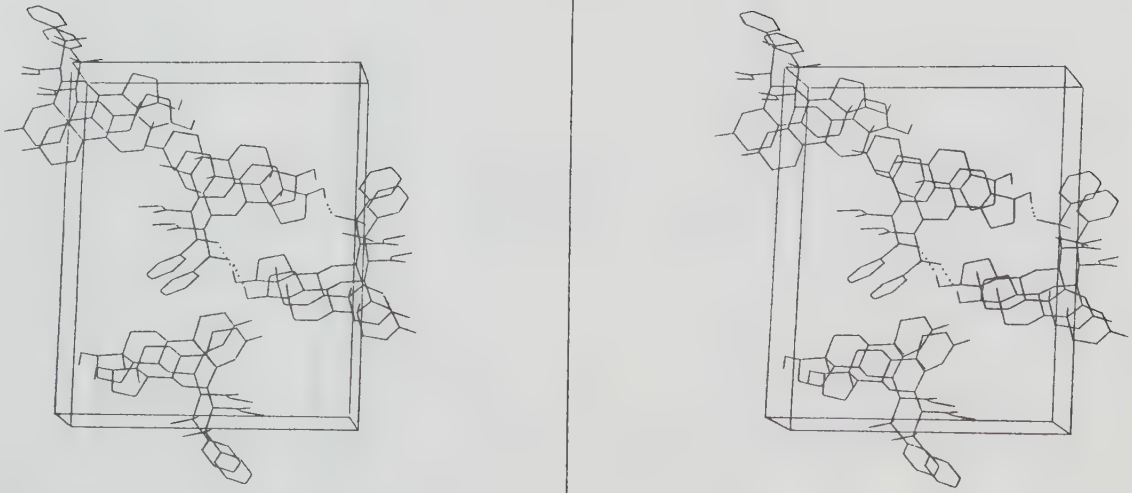


Abb. 61: Stereoskopische Darstellung der Kristallpackung von 17A; die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien gezeichnet; Blickrichtung [100], [010] horizontal

keine intermolekularen H...O-Abstände beobachtet, die kleiner als 2.6 Å oder kleiner als die Summe der Van-der-Waals-Radien sind.

3. Synthese der 6-Methylidencarbonsäurederivate von Testosteron und Progesteron

3.1. Die Spaltung der Steroidmethylester durch Halolyse

Da Vorversuche zur hydrolytischen Spaltung der Methylestergruppen des Malonesterderivates 20 negativ verlaufen sind, wird in der Literatur nach einer Methode gesucht, die sterisch gehinderte Methylester leicht in die Carbonsäuren überführt. Das ist offensichtlich bei der Halolyse nach Taschner und Liberek[21] der Fall, bei der die Steroide mit Lithiumjodid und je nach erforderlicher Siedetemperatur mit Pyridin (Sp. 116°C) oder 2,6-Lutidin (Sp. 145°C) oder 2,4,6-Collidin (Sp. 172°C) unter Rückfluß gekocht werden. Eschenmoser und Mitarb.[19] wandten diese Methode mit Erfolg zur selektiven Spaltung der tertiären Carbomethyoxygruppe in O-Acetyloleanolsäuremethylester an; die Acetoxygruppe wird dabei nicht angegriffen. Während bei der Hydrolyse dieses Triterpenoids die Verhältnisse gerade umgekehrt sind. Hier kann durch milde Alkalibehandlung die Acetoxygruppe selektiv unter Erhalt des sterisch gehinderten Methylesters gespalten werden. Während zur Halolyse dieses tertiären Methylesters achtstündiges Erhitzen in Collidin erforderlich ist, müssen primäre und sekundäre Steroidmethylester nur ebensolange in Lutidin unter Rückfluß gekocht werden. Dabei ist die Ausbeute beim primären Carbonsäurederivat höher als beim sekundären. Kamiya et al.[148] benützen die Methode zur Spaltung einer Methylestergruppe in der Seitenkette eines β-Lactam-Antibiotikums (3-Phthalimidonocardicinsäuremethylester), da bei alkalischer Hydrolyse die Methoxycarbonylgruppe epimerisiert und ein Diastereomeren-Gemisch der entsprechenden Carbonsäure entsteht. Die Halolyse wird in diesem Fall durch 2 1/2-stündiges Erhitzen des Esters mit Lithiumjodid in Pyridin durchgeführt. Meyer und Levinson[149] gelingt die halolytische Spaltung der sterisch gehinderten Ethoxygruppe in 1,1-Dimethyltransdecalin-10-

carbonsäureethylester durch 72-stündiges Rückflußkochen in Collidin mit Lithiumjodid.

Der Vorteil der Halolyse gegenüber der Hydrolyse bei sterisch gehinderten Estern wird von Eschenmoser und Mitarbeitern[19] damit erklärt, daß die Halolyse an der Alkoholkomponente angreift, während es bei der Hydrolyse intermediär zu einer Tetragonalisierung des Carbonylkohlenstoffs kommt. Bei der Halolyse wird demnach die Bindung zwischen Sauerstoff und Alkylrest gespalten, d.h. der Carboxylrest wird durch ein Halogenidanion nukleophil substituiert. Es entsteht also das Alkylhalogenid und das Lithiumsalz der Carbonsäure. In Übereinstimmung mit diesem Mechanismus werden Methylester leichter gespalten als Ethylester und von den drei Lithiumhalogeniden Chlorid, Bromid, Jodid ist letzteres am wirksamsten.

3.1.1. Die Halolyse von 17A

Das Phenylsulfonylessigsäuremethylsäurederivat von Testosteron 17A wird in einem 0.1 molaren Ansatz zunächst vier Stunden mit Lithiumjodid in Pyridin unter Rückfluß gekocht. Das Dünnschichtchromatogramm im System F zeigt, daß der Ester unter diesen Bedingungen nur zu etwa 50 % zur Carbonsäure gespalten wird. Es entsteht außerdem eine geringe Menge eines Nebenprodukts. Wenn man 17A acht Stunden mit 2,6-Lutidin kocht, wird der Methylester fast quantitativ gespalten. Das im vorhergehenden Pyridin-Versuch beobachtete Nebenprodukt tritt hier in beträchtlicher Menge auf. Da es sich aus dem Ethylacetatextrakt nicht mit Natriumhydrogencarbonat rückextrahieren läßt, ist es offensichtlich keine Carbonsäure.

Die Analyse des Hauptprodukts durch Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie und ^{1}H-NMR-Spektroskopie

zeigt, daß dasselbe Reaktionsprodukt gebildet wird, wie bei der unten beschriebenen alkalischen Hydrolyse, nämlich das 6-Methylidencarbonsäurederivat. Beim Nebenprodukt handelt es sich möglicherweise um den Ethylester dieser ungesättigten Carbonsäure.

Da die Ausbeuten bei dieser Methode sehr gering sind, bedingt durch langes Rückflußkochen unter basischen Bedingungen bei hohen Temperaturen (Eliminierung!) und durch die anschließende Chromatographie des Rohprodukts, muß nach einer schonenderen Methode zur Esterspaltung gesucht werden. Als nächstes wird die Ethanolyse versucht, bei der aber der Steroidester 17A ebenfalls im basischen Milieu unter Rückfluß gekocht wird.

3.2. Die Spaltung der Steroidmethylester durch Ethanolyse

Rao et al.[18,150] führen Steroidcarbonsäuremethylester durch Behandeln mit Kaliumhydroxid in wasserfreiem Methanol in die Carbonsäuren über. Diese sogenannte Methanolyse wird von diesen Autoren entweder über Nacht bei Raumtemperatur[18] oder durch 2 1/2-stündiges Kochen unter Rückfluß[150] durchgeführt. Da bei 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden die Gefahr besteht, daß sie mit Methanol reagieren, wird bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen Methanol durch das weniger reaktive Ethanol ersetzt. So ist bekannt, daß ein 6β-Brom-4-pregnen-3-on-steroid mit kochendem Methanol zu 3,3-Dimethoxy-5α-pregnan-6-on-derivat umgewandelt wird[151]. Aus 6β-Bromtestosteronacetat bildet sich beim Umkristallisieren mit Methanol das 5α-Androstan-3,6-dion-derivat[28].

3.2.1. Die Ethanolyse von 17A

Die Ausbeuten bei der 8-stündigen Ethanolyse von 17A sind wie bei der Halolyse sehr unbefriedigend, da Erhitzen des 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroids in KOH/Ethanol zu vielen Nebenreaktionen vor allem zur unerwünschten Eliminierung des Substituenten führen dürften. Andererseits ist die Spaltung des Esters selbst nach acht Stunden noch nicht vollständig.

Das Dünnschichtchromatogramm im System F zeigt außer dem Ausgangsprodukt ein ziemlich polares Haupt- und ein unpolareres Nebenprodukt. Letzteres scheint mit dem Hauptprodukt der Halolyse und dem unten ausführlich diskutierten Hauptprodukt der wässrig-alkalischen Hydrolyse in Ethanol identisch zu sein. Nach der präparativen Schichtchromatographie des aufgearbeiteten Reaktionsansatzes im selben Chromatographiesystem wird das Hauptprodukt ^{1}H-NMR-spektroskopisch untersucht: Im Spektrum sind ebenfalls keine aromatischen Protonen mehr vorhanden. Neben dem Signal für das vinylische H4 ist bei 6.07 ppm ein aufgespaltenes Signal vorhanden, das ebenfalls einem vinylischen Proton zuzuordnen ist. Wie bei dem unten diskutierten Zwischenprodukt bei der Hydrolyse von 19/2 sind auch hier beim Hauptprodukt der Ethanolyse die Signale der Ethylestergruppe vorhanden: CH_3 (1.24 ppm, t, 1H) und CH_2 (4.10 ppm, d, 1H). Es handelt sich also ebenfalls um einen ungesättigten Ethylester. Man kann sich unter den wasserfreien Reaktionsbedingungen noch eher eine basisch katalysierte Umesterung des Methyl- zum Ethylester vorstellen als bei der wässrig-alkalischen Hydrolyse. Auffallend ist, daß das neue vinylische Proton gegenüber dem beim Hydrolyseprodukt um 0.23 ppm tieffeldverschoben ist. Auch dünnschichtchromatographisch sind Ethanolyse- und Hydrolyseprodukt nicht identisch. Bemerkenswert ist ferner die stark polare Eigenschaft des bei der Ethanolyse gebildeten Ethylesters. Er

wandert im Dünnschichtchromatogramm langsamer als die entsprechende Carbonsäure, während das Ethylesterzwischenprodukt bei der Hydrolyse ein wesentlich unpolareres Verhalten zeigt. Möglicherweise ist das eine der beiden Produkte das E- das andere das Z-Isomere. Bei der Hydrolyse bei Raumtemperatur würde dann möglicherweise das kinetisch kontrollierte Produkt, bei der Ethanolyse durch Kochen unter Rückfluß das thermodynamisch kontrollierte Produkt entstehen. In Tab. 52 sind die ^{1}H-chemischen Verschiebungen der bei der Halolyse und Ethanolyse von 17A entstehenden Hauptprodukte denen des entsprechenden Hydrolyseprodukts (s.u.) gegenübergestellt.

Da weder Halolyse noch Ethanolyse befriedigende Ergebnisse zeigen, wird die schon mehrfach erwähnte alkalische Hydrolyse in wässrigem Ethanol bei Raumtemperatur durchgeführt. Unter den schonenderen Reaktionsbedingungen werden bessere Ausbeuten und weniger Nebenprodukte erwartet. Außerdem läßt sich der zeitliche Ablauf der Reaktion besser verfolgen.

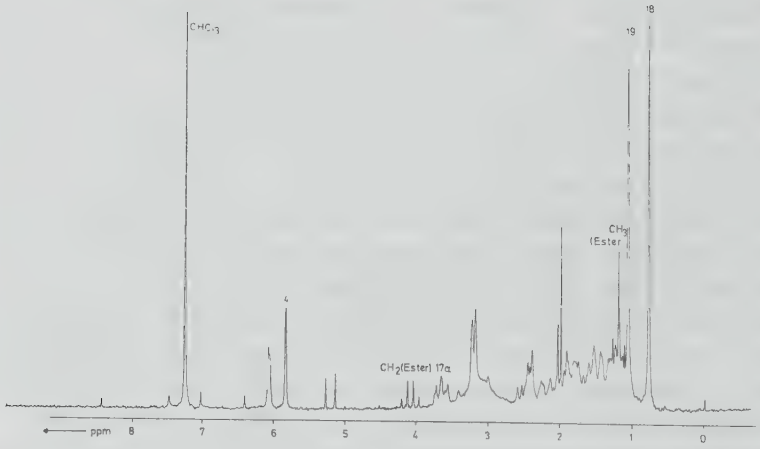


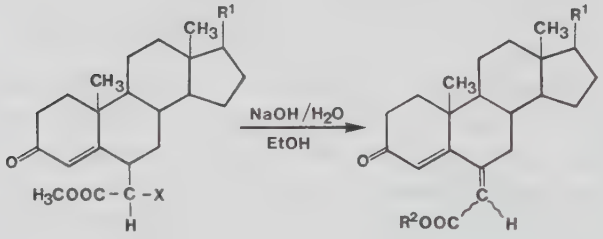
Abb. 62: ^{1}H-NMR-Spektrum (90 MHz) des Ethanolyse-Produkts von 17A in $CDCl_3$

Tab. 52: Die wichtigsten ^{1}H-chemischen Verschiebungen (δ; ppm) der Hauptprodukte der Halolyse, Ethanolyse und Hydrolyse von 17A. Die relativen Rf-Werte beziehen sich auf 17A mit Rf_F : 1.00

	PSET/A 17A	Halolyse Rf_Frel. 0.73	Ethanolyse Rf_Frel. 0.56	Hydrolyse Rf_Frel. 0.73
H18	0.83(s;3H)	0.77(s;3H)	0.82(s;3H)	0.76(s;3H)
H19	1.21(s;3H)	1.08(s;3H)	1.11(s;3H)	1.09(s;3H)
CH_3(Ethylester)			1.24(t;3H) J=7.0 Hz	
CH_3(Methylester)	3.35(s;3H)			
CH_2(Ethylester)			4.10(q;2H) J=7.0 Hz	
H-i(vinyl. neu)		5.85(d;1H)	6.08(d;1H)	5.84(d;1H)
H4	5.69(s;1H)	5.87(s;1H)	5.84(s;1H)	5.87(s;1H)
H (aromat.)	7.53 - 7.95			

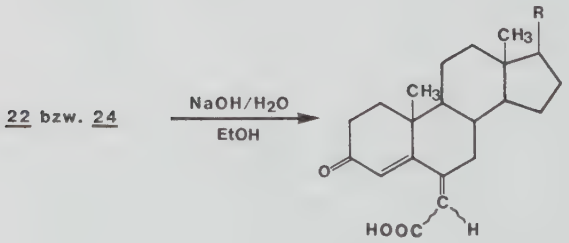
3.3. Die Spaltung der Steroidmethylester 17A und 19/2 durch Alkalibehandlung bei Raumtemperatur. Synthese von Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23 und von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25

Um das Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivat von Testosteron bzw. das Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivat von Progesteron in die entsprechenden Carbonsäurederivate überzuführen, werden die Ester in Anlehnung an eine Arbeits-



17A $R^1 = OH$ $X = SO_2C_6H_5$ 22 $R^1 = OH$ $R^2 = CH_3$

19/2 $R^1 = COCH_3$ $X = SO_2CH_3$ 24 $R^1 = COCH_3$ $R^2 = C_2H_5$



23 R = OH

25 $R = COCH_3$

vorschrift von Trost und Mitarbeitern[102)] der schonenden alkalischen Hydrolyse bei Raumtemperatur unterworfen. Hierbei werden die Ester jeweils mit einem zehnfachen molaren Überschuß von Natriumhydroxid in Ethanol:Wasser = 9:1 behandelt. Die NaOH-Konzentration ist dann 0.1 normal. Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Alkalibehandlung mittels Dünnschichtchromatographie, fällt auf, daß vor dem Entstehen des Endproduktes ein Zwischenprodukt gebildet wird. Während das Zwischenprodukt schon nach wenigen Minuten der Alkalibehandlung auftritt, ist es noch lange Zeit nach dem Verschwinden des Ausgangsprodukts im Reaktionsansatz vorhanden. Nach 2 1/2 - 3 Stunden Reaktionszeit ist das Zwischenprodukt vorherrschend. Nach 9 bzw. 15 Stunden ist nur noch Endprodukt vorhanden.

3.4. Die spektroskopische Untersuchung von 23 und 25

3.4.1. Die Massenspektren

Das Massenspektrum des Endprodukts zeigt beim Testosteronderivat einen Molekülpeak von m/e = 344, beim Progesteronderivat von m/e 370. Das bedeutet, daß bei der Alkalibehandlung der Phenylsulfonyl- bzw. Methylsulfonylrest eliminiert wird und dabei in das Molekül eine exocyclische Doppelbindung eingeführt wird. Das ist zunächst unerwartet, da das äquatoriale α-ständige Wasserstoffatom an C6 und der Phenylsulfonyl- bzw. Methylsulfonylrest nicht antiperiplanar angeordnet sind. Die leichte bimolekulare Eliminierung dürfte auf die Ausbildung eines ausgedehnten konjugierten Systems zurückzuführen sein, das sich vom ursprünglich vorhandenen konjugierten System O3-C3-C4-C5 bis zur neuen C6-C-a Doppelbindung erstreckt. Es wäre denkbar, daß auch die Carboxylgruppe in das konjugierte System mit einbezogen wird.

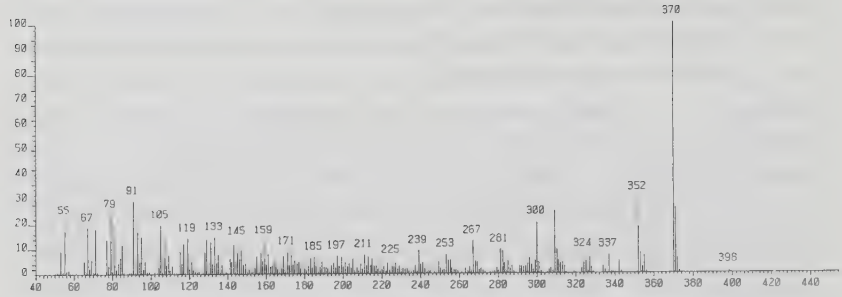


Abb. 63: Massenspektrum von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25 (M = 370); Ionenquelle-Temperatur 200°C; Elektronenenergie 70 eV

3.4.2. Die UV-Spektren

Die UV-Spektren der beiden 6-Methylidencarbonsäurederivate 23 und 25 zeigen in Dioxan Maxima bei 261 nm mit Molextinktionen von 13 800. Die Maxima sind gegenüber der Ausgangsverbindung um 26 nm bathochrom verschoben. In der Literatur[152)] wird für 17β-Acetoxy-6-methylen-androst-4-en-3-on ein UV-Maximum bei 260 nm in Ethanol mit einer Molextinktion von 11 600 angegeben. Das würde bedeuten, daß die Carboxylgruppe in 23 bzw. 25 keine weitere Rotverschiebung des Maximums bewirkt. Sie ist also offensichtlich doch nicht in das konjugierte System mit einbezogen.

3.4.3. Die ^{1}H-NMR-Spektren

Im ^{1}H-NMR-Spektrum des Testosteronderivates sind keine aromatischen Protonen mehr vorhanden. Im Spektrum des

Progesteronderivates (Abb. 71) fehlt das Methylsingulett der Methylsulfonylgruppe. Wenn das ^{1}H-NMR-Spektrum des Testosteronderivates in $CDCl_3$ gemessen wird, sind zwei vinylische Protonen vorhanden: H4 bei 5.87 ppm, es hat gegenüber dem Ausgangsprodukt eine geringe Tieffeldverschiebung erfahren, und ein nicht aufgelöstes Multiplett bei 5.84 ppm, das dem neuen vinylischen Proton zuzuordnen ist (Tab. 52; siehe auch Tab. 55). Die Signalaufspaltung kommt durch Fernkopplung dieses Protons mit H7α zustande (s.u.). Bei der Messung in ^{12}C-DMSO d6 fallen beide Signale zu einem Singulett bei 5.71 ppm zusammen.

In der Literatur[153)] werden für die beiden Protonen der 6-Methylengruppen von 17α-Hydroxy-6-methylen-pregn-4-en-3-on Multipletts mit den Werten 4.96 und 5.08 ppm angegeben. Die Kopplungskonstante, bezogen auf die Halbwertsbreite, beträgt 4 Hz. Das Singulett für H4 wird mit 5.93 ppm angegeben.

3.4.4. Die ^{13}C-NMR-Spektren

Das ^{13}C-NMR-Spektrum wird wegen der schlechten Löslichkeit des Testosteronderivates 23 in $CDCl_3$ in ^{12}C-DMSO d6 aufgenommen. In ^{12}C-angereicherten Lösungsmitteln erscheinen keine Lösungsmittelsignale, die mit den Steroidsignalen überlappen könnten. Da auch im Off-resonance-Spektrum wegen Überlappung der Signale im mittleren Hochfeldbereich keine eindeutige Zuordnung aller Signale möglich ist, wird vom Progesteronmethylidencarbonsäurederivat 25, das in $CDCl_3$ gut löslich ist, eine Spin-Echo-Spektrum in diesem Lösungsmittel aufgenommen.

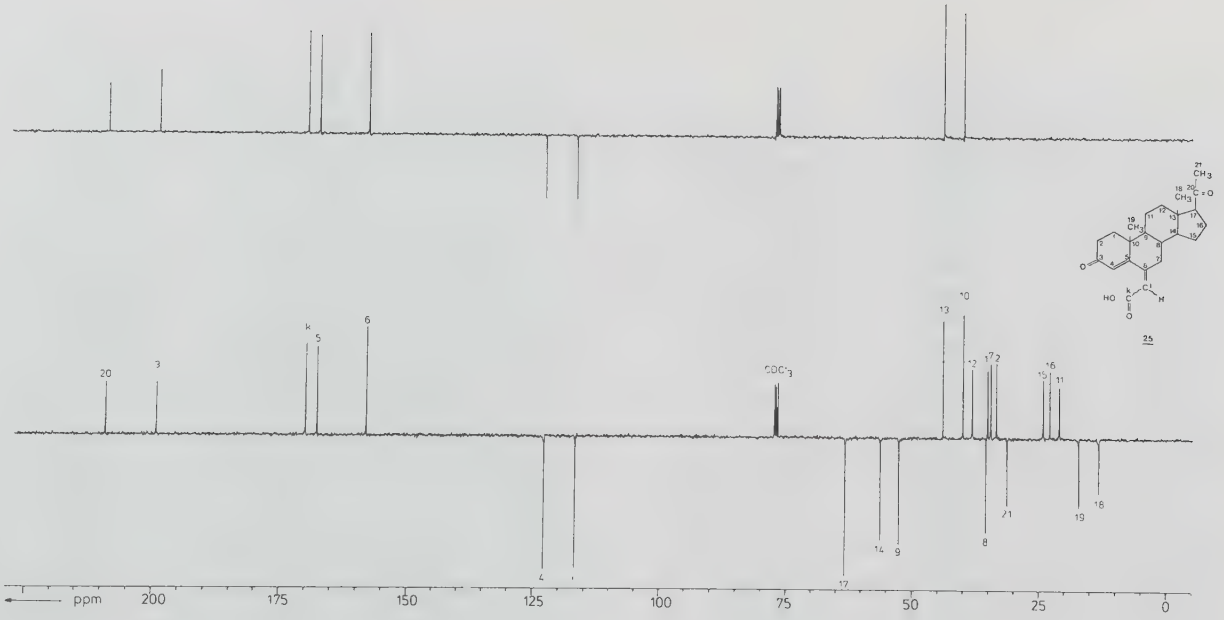


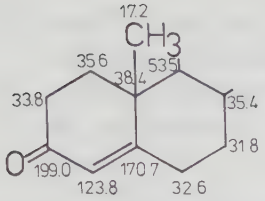
Abb. 64: ^{13}C-NMR-Spektrum (Spin Echo; 100 MHz; 1024 Pulsinterferogramme) von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25; ca. 100 mg in 1 ml $CDCl_3$.
Oben: Programm GASPE; positive Signale: quartäre C-Atome.
Unten: Programm J-Mod; positive Signale: sekundäre und quartäre C-Atome; negative Signale: primäre und tertiäre C-Atome

Die Zuordnungen der Signale erfolgt durch Signalvergleich mit Progesteron[88,113] und mit 3,3-Dimethylacrylsäure (Komponente Nr. 335)[51]. Die ppm-Werte dieser ungesättigten Carbonsäure sind nur aus einer Messung der flüssigen Reinsubstanz bekannt und sind daher nicht ohne weiteres mit denen aus einer $CDCl_3$-Lösung zu vergleichen. Dennoch lassen sich C6, das neu entstandene vinylische C-Atom C-i und das Carboxyl-C-Atom C-k zuordnen. Dabei wird angenommen, daß das quartäre C5, das sich prinzipiell nicht vom Carboxyl-C-Atom der Carboxylgruppe unterscheiden läßt, eine Hochfeldverschiebung von -3.3 ppm erfährt und damit den Wert 167.8 ppm hat. Eine analoge Verschiebung läßt sich bei den 6β-substituierten Esterderivaten beobachten. So erfährt C5 bei 21 eine Hochfeldverschiebung von -4.3 ppm, bei 19/1 eine solche von -4.4 ppm. Der Wert 170.1 ppm wird dann dem Carboxyl-C-Atom C-k zugeordnet.

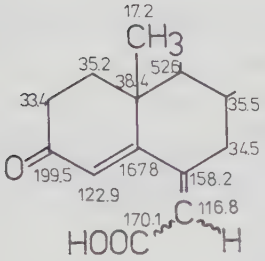
Unter der Annahme, daß C2 durch die Substitution an C6 kaum verändert wird, bleibt nur noch die Zuordnung der Signale 35.2 und 34.5 ppm zu C1 und C7 offen. Als Zuordnungshilfe kann auch das 6-Ketoderivat eines 4-En-3-ketosteroids herangezogen werden[36]. Bei Androst-4-en-3,6,17-trion behält C1 ebenso wie C2 und C3 seinen Wert bei. Verfährt man beim 6-Methylidenderivat analog, behält auch hier C1 seinen Wert nahezu bei: 35.2 ppm wird C1, folglich 34.5 dann C7 zugeordnet. Das Tieffeldverschiebungsinkrement für C7 beträgt dann nur +2.7 ppm verglichen mit +13.7 ppm beim 6-Ketoderivat. Das Carbonyl-O-Atom übt auf das Carbonyl-C-Atom einen stärkeren Elektronenzug als das Methyliden-C-Atom auf C6 aus, was zu einer stärkeren Entschirmung, entsprechend einer größeren Tieffeldverschiebung führt. Beim genannten 6-Ketoderivat hat C6 die chemische Verschiebung 201.2 ppm mit einer Tieffeldverschiebung von +168.6 ppm; beim Methylidencarbonsäurederivat 25 beträgt der Wert 158.2 ppm mit einer Tieffeldverschiebung von nur +125.6 ppm. Entsprechend geringer muß auch der Einfluß auf C7 sein.

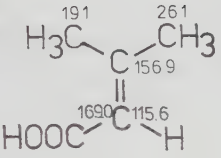
Tab. 53: ^{13}C-chemische Verschiebungen der 6-Methyliden-carbonsäurederivate von Progesteron 25 und von Testosteron 23

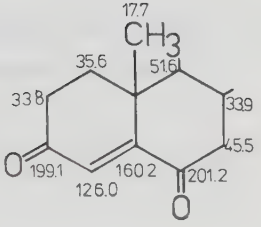
C-Atom	Prog	MCP 25	Testo	MCT 23
	$CDCl_3$	$CDCl_3$	DMSO d6	^{12}C-DMSO d6
1	35.6	35.2	35.1	35.0
2	33.8	33.4	33.5	33.6
3	199.0	199.5	197.5	198.3
4	123.8	122.9	123.0	122.1
5	170.7	167.8	170.6	167.8
6	32.6	158.2	31.9	155.1
7	31.8	34.5	31.3	33.8
8	35.4	35.5	35.1	35.6
9	53.5	52.6	53.5	52.5
10	38.4	40.0	38.1	39.8
11	20.9	20.9	20.2	20.5
12	38.4	38.2	36.3	36.3
13	43.7	44.0	42.3	42.8
14	55.8	56.2	50.0	50.5
15	24.2	24.1	23.0	23.2
16	22.7	22.7	29.8	30.0
17	63.3	63.2	79.7	79.9
18	13.1	13.2	11.1	11.3
19	17.2	17.0	18.9	17.0
20	208.9	209.4		
21	31.3	31.3		
i		116.8		117.8
k		170.1		166.8

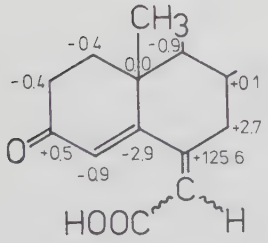


Prog.









25

Abb. 65: Zuordnungen der ^{13}C-chemischen Verschiebungen und Verschiebungsinkremente bei Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25

Bei C5 ist der Einfluß gerade umgekehrt: Je stärker der Elektronenzug an C6 desto größer ist die Hochfeldverschiebung des C5-Signals. So hat C5 beim 6-Ketoderivat den Wert 160.2 ppm (Inkrement -10.5 ppm) beim 6-Methylidenderivat 25 von 167.8 ppm (Inkrement -2.9 ppm) im Vergleich zu 170.7 ppm bei Progesteron.

In Abb. 65 werden die Ergebnisse aus den Tabelle 53 und 54 veranschaulicht.

Tab. 54: ^{13}C-chemische Verschiebungsinkremente für Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25

C-Atom	MCP 25
1	- 0.4
2	- 0.4
3	+ 0.5
4	- 0.9
5	- 2.9
6	+ 125.6
7	+ 2.7
8	+ 0.1
9	+ 1.6
10	+ 1.6
19	- 0.2

3.4.5. Das IR-Spektrum von 25

In Abb. 66 wird das IR-Spektrum von 25 gezeigt. Die Banden der drei Carbonylgruppen und der beiden Doppelbindungen überlagern sich zum Teil und sind dann nur als Schultern zu erkennen. Eine zweifelsfreie Zuordnung ist daher nicht möglich.

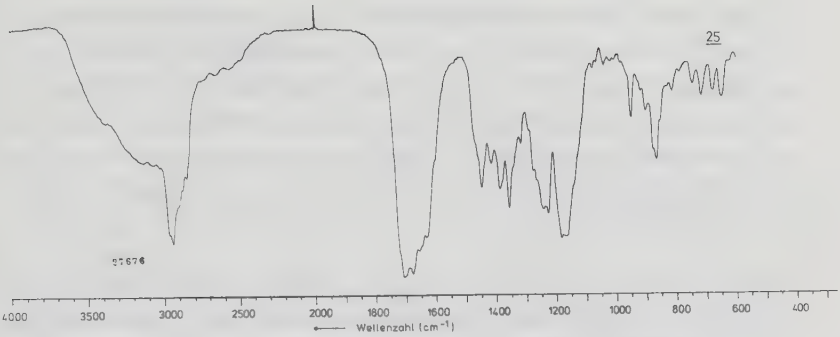


Abb. 66: IR-Spektrum von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25, aufgenommen in KBr

3.4.6. Die CD-Spektren

Der n → π*-Übergang

Nach Snatzke[138] liegen bei den 6-Methylen-4-en-3-ketosteroiden ähnliche Verhältnisse wie bei den 4,6-Dienonen vor. Das Enonsystem ist wahrscheinlich eingeebnet, die zweite cisoide exocyclische Doppelbindung wäre erst beim Übergang in die Halbwannenform koplanar zur 4-En-Doppelbindung. Es wird ein positiver Cottoneffekt mit nicht sehr hoher Intensität erwartet. Bei 4,6-Dienonen beträgt die molare Elliptizität etwa + 11000.

Im CD-Spektrum der Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23, gemessen in Dioxan, hat der n → π*-Übergang einen langwelligen positiven Cottoneffekt ohne Feinstruktur mit einem Maximum bei 355 nm, der sich von 400 bis 317 nm erstreckt. Die molare Elliptizität beträgt +4690. Es folgt ein negativer Cottoneffekt bei 302.5 nm mit einer molare Ellipti-zität von -3520.

Beim zuerst genannten positiven Cottoneffekt dürfte es sich um den n → π^*-Übergang des 3-On-4-en-Chromophors handeln, der wegen der 6-Substitution sein Vorzeichen gegenüber Testosteron umkehrt. Er zeigt damit das Verhalten eines 6β-substituierten Derivats. Das Maximum liegt ähnlich wie bei den 6β-Bromderivaten, die Intensität ist etwa halb so groß. Gegenüber den 6β-CC-verknüpften Derivaten ist die Intensität aber wesentlich höher.

Aus den ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten ist bekannt, daß H19 bzw. C19 durch die 6-Methylidengruppe nicht beeinflußt werden, wenn man von einer geringen Hochfeldverschiebung von H19 um 0.1 ppm absieht. Auch die C2-Signale behalten wie bei den 6β-Derivaten ihre Werte bei. Das beweist den unabhängigen Einfluß der 6-Methylidengruppe auf den Chromophor, wahrscheinlich durch Orbitalüberlappung beider Doppelbindungssysteme.

Der negative Cottoneffekt bei 302.5 nm liegt im Bereich einer gesättigten Carbonylbande und gehört zur 6-Methylidengruppe. Er ist analog zum 4-En-6-ketosteroid, dessen Ketogruppe ebenfalls cisoid angeordnet ist. Der Austausch der Sauerstoffunktion gegen Kohlenstoff hat offensichtlich keinen Einfluß auf den Cottoneffekt.

Beim Progesteron-6-methylidenderivat 25 wird der eben diskutierte negative Cottoneffekt von der gesättigten Carbonylbande der C20-Carbonylgruppe des 17β-$COCH_3$-Substituenten mit positivem Cottoneffekt überlagert; es erfolgt kein Null-Durchgang und die Maxima werden kompensiert. Da der Betrag der molaren Elliptizität des positiven Cottoneffektes etwa drei mal größer ist, erfolgt ein Anstieg der Intensität in den positiven Bereich.

Der $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang

Der zum UV-Maximum bei 261 nm gehörende $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang von 23 bzw. 25 bei 263 bzw. 265 nm ist positiv; es erfolgt also keine Vorzeichenumkehr gegenüber dem unsubstituierten Steroid. Die molare Elliptizität ist etwa doppelt so groß wie bei den entsprechenden 6β-Brom-4-en-3-ketosteroiden.

Der noch energiereichere Übergang wird von der Messung nicht mehr erfaßt und liegt bei ca. 200 nm; er hat negatives Vorzeichen. Bei unsubstituierten und 6β-substituierten 4-En-3-ketosteroiden ist der Cottoneffekt dieses Übergangs immer positiv. Bei einer Analogie zum 4-En-6-on-System wie sie oben für den $n \rightarrow \pi^*$-Übergang dargelegt wird, müßte nach Burgstahler und Barkhurst[41] ein positiver Cotton-effekt resultieren.

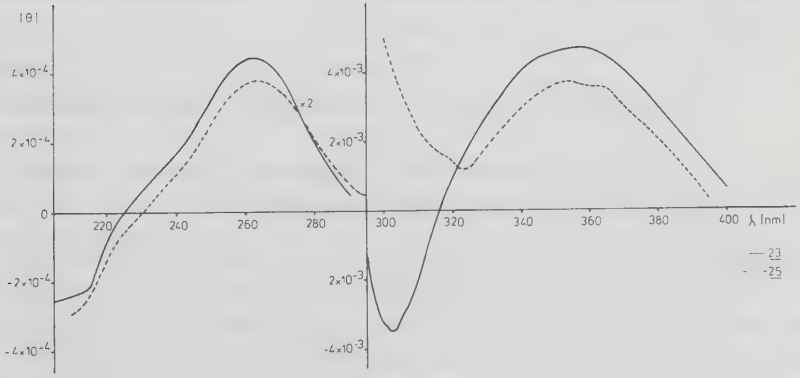


Abb. 67: CD-Spektren von Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23 und von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25 in Dioxan

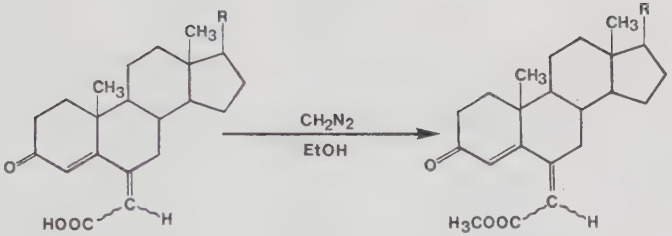
Tab. 57: Maxima und Molextinktionen aus den UV-Spektren, Cottoneffekte und molare Elliptizitäten aus den CD-Spektren der 6-Methylidencarbonsäurederivate von Testosteron 23 und von Progesteron 25

MCT 23				MCP 25			
UV		CD		UV		CD	
λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]	λ(nm)	ε	λ(nm)	[θ]
		355	+ 4690			355	+ 3700
		317	± 0				
		302.5	- 3520				
		294	± 0				
261	13800	263	+88640	261	13800	265	+75240
		224	± 0			230	± 0
		ca.210	ca.-48230			ca.210	ca.-59400

3.5. Die Untersuchung der Eliminierung/Hydrolyse-Reaktion

3.5.1. Die HPLC-Untersuchung der Zwischenprodukte 22 bzw. 24 und des Methylesters 22 und 26

Um weitere Informationen über das bei der Alkalibehandlung von 17A und 19/2 auftretende Zwischenprodukt zu erhalten, werden Partialhydrolysen der Reaktionsansätze mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie untersucht. Außerdem wird das Endprodukt, die ungesättigte Carbonsäure mittels Diazomethan in den Methylester überführt und die Retentionszeit dieses Esters mit dem Zwischenprodukt verglichen.



23 R=OH
25 R=COCH3

22 R=OH
26 R=COCH3

Chromatographiert man den nach 2 1/2 Stunden Reaktionszeit aufgearbeiteten Reaktionsansatz des Testosteronderivats in einer Umkehrphasensäule (RP 18) mit Methanol:Wasser:Propionsäure = 70:30:0.1 als Elutionsmittel, so wird zunächst nach ca.1 Minute Retentionszeit das Endprodukt, die ungesättigte Steroidcarbonsäure 23 eluiert, nach ca. 1 1/2 Minuten das Ausgangsprodukt 17A, das wegen der Phenylsulfonylgruppe noch relativ polar ist. Nach ca. 3 1/2 Minuten wird das Zwischenprodukt 22 eluiert. Die Reihenfolge der Elution ist also wie erwartet gerade umgekehrt wie in der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel im System F (Chloroform: Ethanol: Eisessig = 92:8:1). Es wird angenommen, daß es sich bei dem Zwischenprodukt um den ungesättigten Methylester handelt. Wenn man daher 23 mit Diazomethan behandelt, sollte sich der Methylester 22 bilden. Das ist nach dem chromatographischen Verhalten beim Testosteronderivat wahrscheinlich auch der Fall. Auffallend ist, daß noch ein Nebenprodukt 22a gebildet wird. Das Verhältnis 22:22a beträgt 4.2:1 oder 80.8%:19.2%. Entweder enthält das Endprodukt 23 zwei Carbonsäuren, die sich unter diesen Bedingungen nicht trennen lassen, oder es tritt eine teilweise Umlagerung zu einem

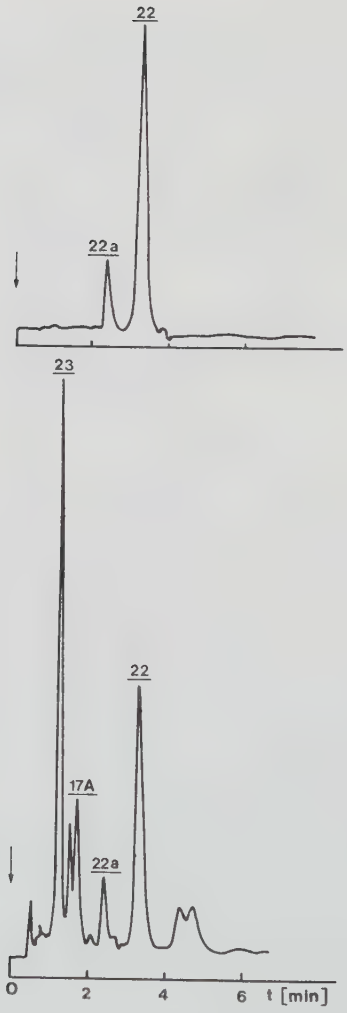


Abb. 68: HPLC: RP-18 (Bedingungen siehe V.2.5.); unten: partielle alkalische Eliminierung / Hydrolyse des Testosteronderivates 17A; Endprodukt: 6-Methylidencarbonsäure 23; Zwischenprodukt: 6-Methylidencarbonsäuremethylester 22 mit Nebenprodukt 22a. Oben: Veresterungsprodukt (Diazomethan) von 23

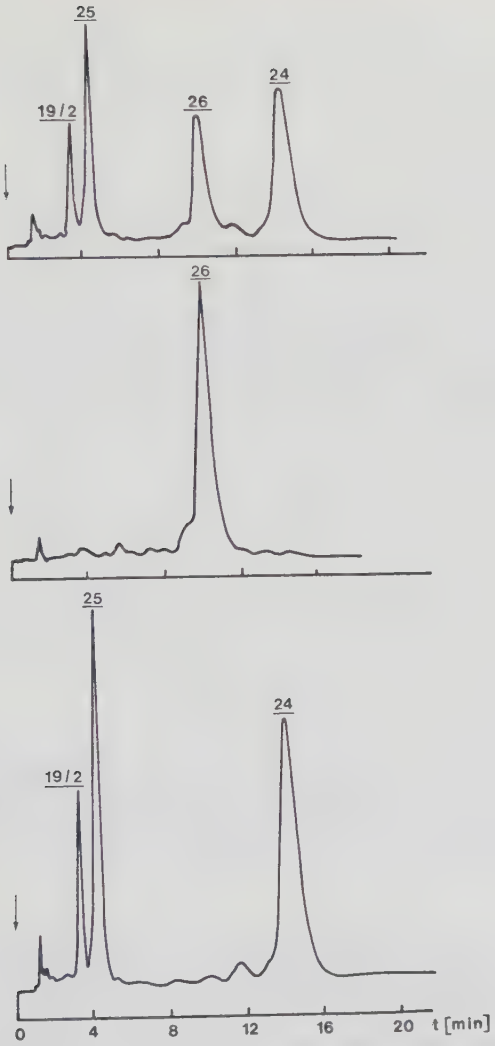


Abb. 69: HPLC: RP-18 (Bedingungen siehe V.2.5.) unten: partielle alkalische Eliminierung/Hydrolyse des Progesteronderivates 19/2. Endprodukt: 6-Methylidencarbonsäure 25; Zwischenprodukt: 6-Methylidencarbonsäuremethylester 26. Oben: künstliche Mischung: partielle alkalische Eliminierung/Hydrolyse von 19/2 mit 26

Isomeren auf. Dasselbe Produktverhältnis findet man auch im Partialhydrolysat, falls der Peak vor 22 identisch mit dem genannten Nebenprodukt ist.

Führt man dieselbe Versuchsanordnung mit dem Partialhydrolysat des Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivates von Progesteron 19/2 nach zwei Stunden Reaktionszeit durch, ergibt sich ein anderes Bild: Nach ca. 3 Minuten wird das Ausgangsprodukt 19/2 eluiert, erst dann nach fast 5 Minuten das Endprodukt 25, die ungesättigte Carbonsäure. Dieses chromatographische Verhalten ist also gerade umgekehrt wie beim Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivat von Testosteron. Das Zwischenprodukt 24, der ungesättigte Ester, wird erst nach ca. 15 Minuten eluiert. Die Elution in der Umkehrphasensäule ist also nicht umgekehrt wie in der Dünnschichtchromatographie. Die Polarität des Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivates wirkt sich also nur in der RP-18-Säule aus, nicht aber in der Dünnschichtchromatographie, wo die drei Substanzen in gleicher Reihenfolge wie die Spaltprodukte von 17A wandern.

Läßt man das isolierte Endprodukt 25 mit Diazomethan reagieren, so wird der gebildete Methylester 26 schon nach ca. 11 Minuten eluiert. Er ist also nicht identisch mit dem bei der Partialhydrolyse gebildeten Zwischenprodukt 24.

3.5.2. Die MS- und ^{1}H-NMR-Spektren von 24 und 26

Das Zwischenprodukt 24 wird daher aus einer 2 1/2-stündigen Partialhydrolyse durch Chromatographie an einer Kieselgelfertigsäule Si 60A isoliert und mit dem durch Diazomethanbehandlung des Endproduktes erhaltenen Methylester 26 durch Massenspektroskopie (Abb. 70) und ^{1}H-NMR-Spektroskopie (Abb. 71, 72 und Tab. 55) verglichen. Beim Methylester sind die Werte wie erwartet. Die Masse ist gegenüber der Carbonsäure um 14 erhöht. Im ^{1}H-NMR-Spektrum tritt das Ester-

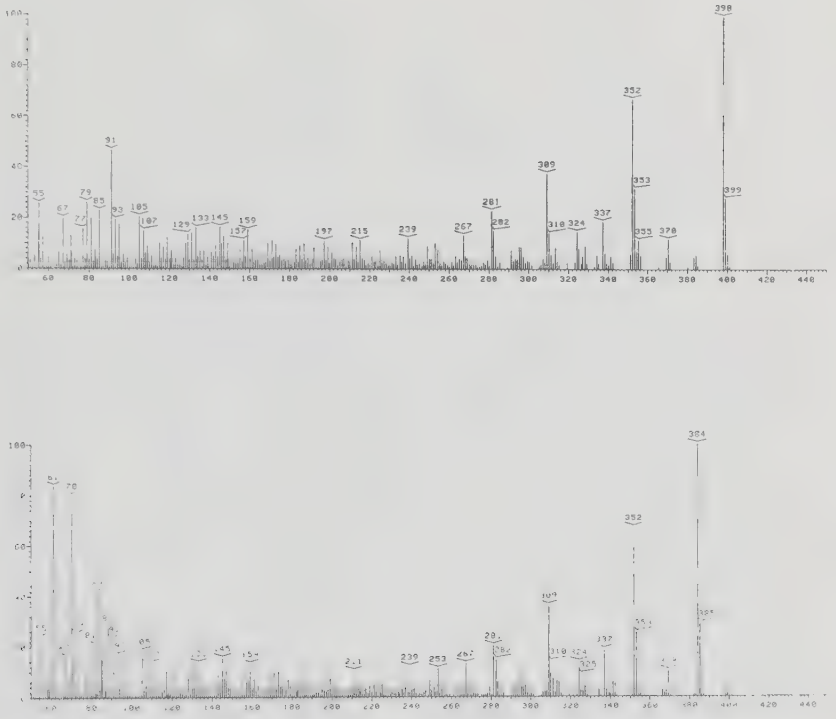


Abb. 70: Massenspektren von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-ethylester 24 (M = 398) und von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-methylester 26 (M = 384); Ionenquelle-Temperatur 200°C; Elektronenenergie 70 eV

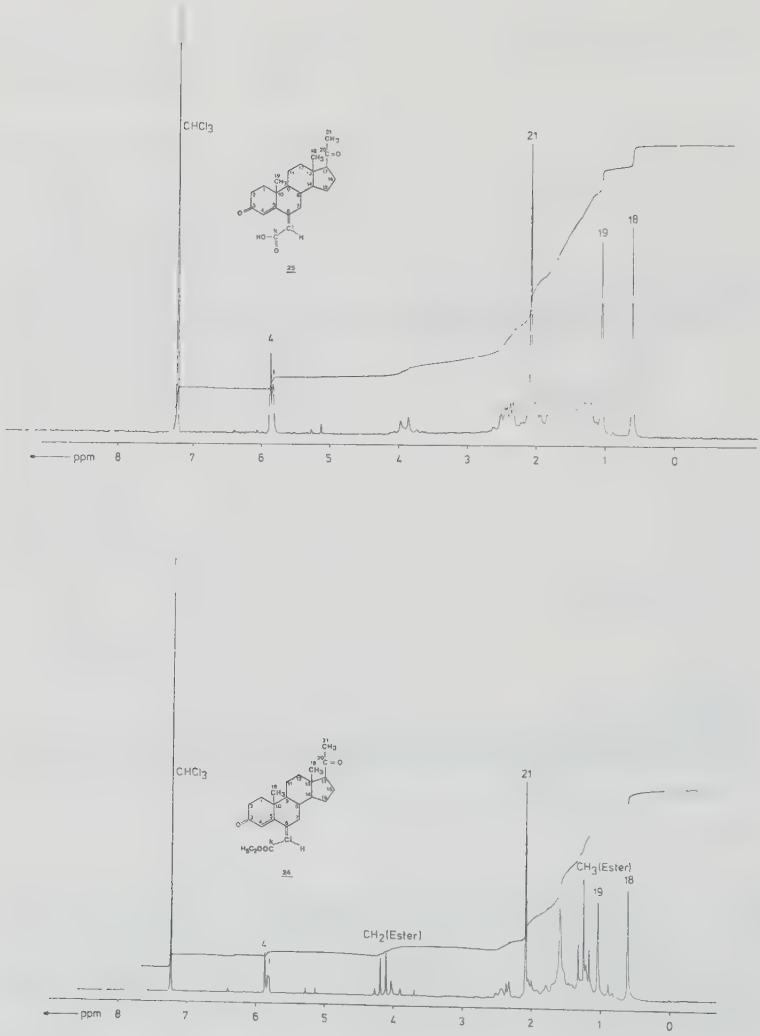


Abb. 71: ^{1}H-NMR-Spektren (90 MHz) von Progesteron-6-methylidencarbonsäure 25 und von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-ethylester 24 in $CDCl_3$

Tab. 55: Die wichtigsten ^{1}H-NMR-chemische Verschiebungen (δ; ppm; 90 MHz; $CDCl_3$) der Progesteronderivate 19/2, 24, 25 und 26

	Methylester (Methylsulfonyl.) 19/2	Ethylester (ungesätt.) 24	Methylester (ungesätt.) 26	Carbonsäure (ungesätt.) 25
H18	0.70(s;3H)	0.64(s;3H)	0.64(s;3H)	0.65(s;3H)
H19	1.28(s;3H)	1.07(s;3H)	1.07(s;3H)	1.09(s;3H)
CH_3(Ethylester)		1.27(t;3H) J=7.0 Hz		
H21	2.10(s;3H)	2.10(s;3H)	2.11(s;3H)	2.11(s;3H)
$CH_3(SO_2)$	3.00(s;3H)			
CH_3(Methylester)	3.71(s;3H)		3.70(s;3H)	
CH_2(Ethylester)		4.16(q;2H)		
H-i(vinyl. neu)		5.82(d;1H)	5.83(d;1H)	5.85(d;1H)
H4	5.74(s;1H)	5.86(s;1H)	5.86(s;1H)	5.88(s;1H)

methylsingulett bei 3.70 ppm auf. Die anderen Signale: H18, H19, H4 und das neue vinylische Signal sind im Vergleich zur Carbonsäure unverändert (siehe Tab. 55).

Das Massenspektrum des Zwischenproduktes 24 weist eine um 28 Einheiten höhere Masse auf als die Carbonsäure. Im ^{1}H-NMR-Spektrum sind die Signale für H18 und H19 genau wie bei der ungesättigten Carbonsäure 25 und dessen Methylester 26 gegenüber denen des Methylsulfonylesters 19/2 leicht hochfeldverschoben. Auch das Signal der Methylsulfonylgruppe ist nicht mehr vorhanden. Unerwartet ist das Fehlen des Estermethylsinguletts bei 3.70 ppm. Statt dessen sind die Signale der Ethylestergruppe, CH_3 bei 1.27 ppm (t) und CH_2 bei 4.16 ppm (q) mit einer Kopplungskonstante von 7.0 Hz vorhanden. Die Masse 298 paßt zum ungesättigten Ethylester.

Das bedeutet, daß unter den Reaktionsbedingungen (0.1 n NaOH in Ethanol:Wasser = 9:1) fast gleichzeitig zur β-Eliminierung der Methylsulfonylgruppe eine basenkatalysierte Umesterung des Methylesters zum Ethylester schon nach wenigen Minuten Reaktionsdauer eintritt. Die anschließende Hydrolyse des Ethylesters zur Carbonsäure ist ein wesentlich langsamerer Reaktionsschritt.

3.5.3. Das 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 26

Das 400 MHz-Protonenspektrum des Progesteron-6-methylidencarbonsäuremethylesters 26 (Abb. 72,73 und Tab. 56) zeigt im Bereich von 5.8 bis 5.9 ppm zwei vinylische Signale, die beide in Dubletts mit kleiner Kopplungskonstante aufgespalten sind. Es handelt sich nicht um Einzelsignale eines Isomerengemisches, mit etwa gleicher Intensität, da sonst im ^{13}C-NMR-Spektrum die Signale der entsprechenden C-Atome als Doppelsignale auftreten müßten. Beide Signalaufspaltungen sind die Folge von Fernkopplungen. Das stärker tieffeldverschobene der beiden vinylischen Signale ist H4 zuzuordnen,

analog zu den chemischen Verschiebungen im ^{13}C-NMR-Spektrum. Hier hat C4 den Wert 122.9 ppm, das neu entstandene ungesättigte C-Atom C-i den Wert 116.8 ppm. H4 hat im 400 mHz-Spektrum den Wert 5.86 ppm und zeigt eine geringe Aufspaltung in ein Dublett mit der Kopplungskonstante J = 0.5 Hz. Die Fernkopplung von H4 mit dem neuen vinylischen H-i geht über fünf Bindungen. Sie entspricht in etwa der Kopplung von paraständigen H-Atomen in Aromaten; dort liegt die Kopplungskonstante zwischen 0 und 1 Hz.

Tab. 56: Die ^{1}H-NMR-chemischen Verschiebungen (δ; ppm; 400 mHz; $CDCl_3$) und Fernkopplungskonstanten (J; Hz) der beiden vinylischen Protonen von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-methylester 26

	ppm	J(Hz)
H-i (vinyl. neu)	5.82(d)	1.8
H4	5.86(d)	0.5

Das Signal bei 5.82 ppm ist dann dem neu eingeführten vinylischen H-Atom H-i an der exocyclischen Doppelbindung zuzuordnen. Die Kopplungskonstante beträgt 1.8 Hz. Bei dieser Fernkopplung handelt es sich um eine allylische Kopplung mit H7α oder H7β. Leider kann man aus der Kopplungskonstante nicht entscheiden, ob es sich um eine cisoid- oder transoid-allylische Kopplung handelt und damit um eine Z- oder E-Konfiguration.

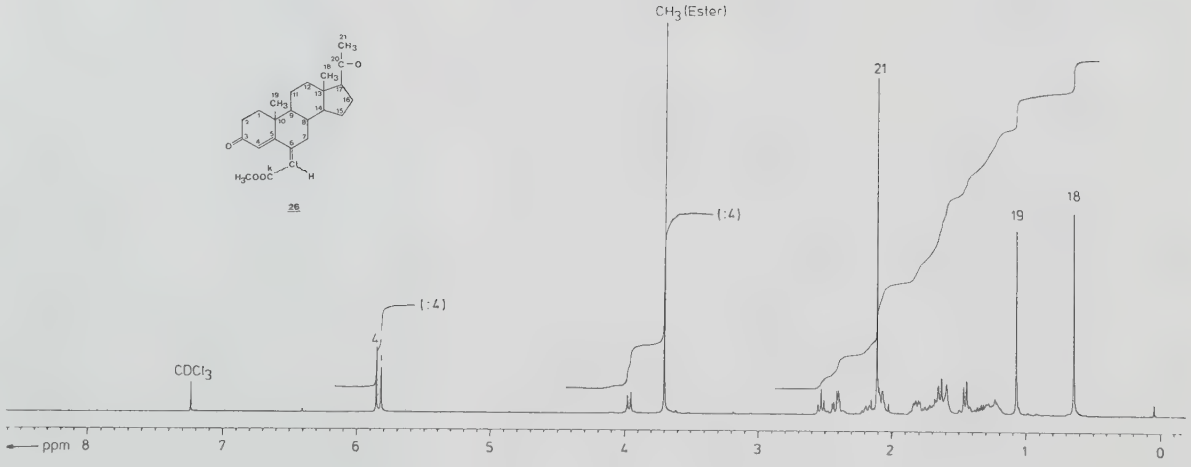


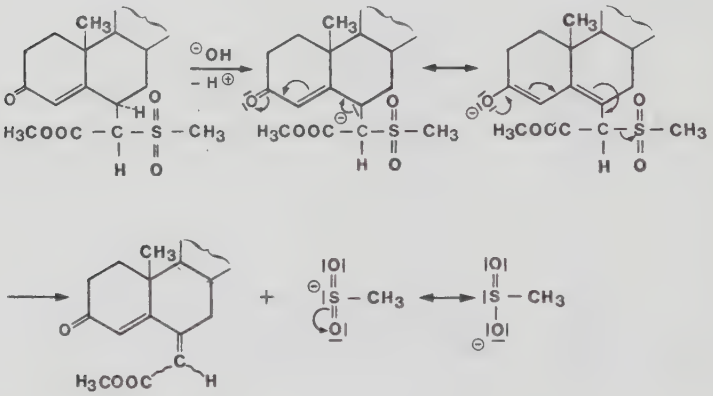
Abb. 72: ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-methylester 26 in $CDCl_3$

Abb. 73: Signale von H4 (5.86 ppm) und H-i (5.82 ppm) aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Progesteron-6-methylidencarbonsäure-methylester 26 in $CDCl_3$ (Abb. 72)

3.6. Der Mechanismus der Eliminierung und Hydrolyse

Nach den Reaktionsbedingungen handelt es sich um eine β-Eliminierung, die nach dem E2-Mechanismus abläuft. Obwohl das Wasserstoffatom an dem der Sulfonylgruppe benachbarten C-Atom acider ist als H6α wird doch letzteres von der Base bevorzugt angegriffen, da es dadurch zu einer mesomeriestabilisierten Enolisierung unter Ausbildung einer C5-C6-Doppelbindung kommt. Anschließend wird das ursprüngliche 4-En-3-ketosystem zurückgebildet und durch die neuentstehende

exocyclische Doppelbindung erweitert. Dabei wird der Methyl- bzw. Phenylsulfonylrest als Methyl- bzw. Phenylsulfinat eliminiert. Zur Leichtigkeit der Reaktion trägt außer der Ausbildung des ausgedehnten konjugierten Systems auch die Mesomeriestabilisierung der Abgangsgruppe bei.



Der entstandene α,β-ungesättigte Ester läßt sich dann leicht verseifen, da keine sterische Hinderung durch die sperrigen Methylsulfonyl- oder Phenylsulfonylreste mehr vorhanden ist. Wenn man versucht die beiden diastereotopen Methylestergruppen des 6β-Malonesterderivates von Testosteron 20 unter den gleichen Bedingungen zu verseifen, entsteht auch nach längerer Reaktionszeit kein einheitliches Produkt. Die Hydrolyse dürfte in zwei Stufen verlaufen und wird sterisch gehindert sein.

Kürzlich ist von Annen et al.[153] über eine einstufige Synthese von unsubstituierten 6-Methylen-4-en-3-ketosteroiden durch Reaktion von 4-En-3-ketosteroiden mit Formaldehydacetalen berichtet worden. Früher war die Einführung der 6-Methylengruppe nur über mehrstufige Synthesen über 3,5-

Dienolzwischenstufen möglich. Auch die einstufige Synthese läuft über eine 3,5-Dienol-Aktivierung ab. Damit laufen die hier beschriebene und die aus der Literatur bekannten Synthesen nach einem prinzipiell ähnlichen Mechanismus ab.

IV. DIE SYNTHESE DER KÜNSTLICHEN ANTIGENE

1. Das Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat und das Testosteron-6-methylidencarbonsäure(23)-Rinderserumalbumin-Konjugat

1.1. Die Kupplung der Steroidcarbonsäuren 2 und 23 an Rinderserumalbumin

Die Kupplung der Steroidcarbonsäure an die ε-Aminogruppen der Lysinreste des Trägerproteins wird nach den bei der Peptidsynthese gewährten Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung durchgeführt[154]. Im Gegensatz zur klassischen Peptidsynthese ist hier die Aminokomponente ein Protein, das ohne denaturiert zu werden, nur in wässrigem Milieu löslich ist. Es sind vor allem drei Methoden die dieser Tatsache Rechnung tragen für die Synthese der künstlichen Antigene mit Erfolg angewandt worden[4,5,155]: Die Carbodiimid-[10,11], die Anhydrid[156-158] und die Carbonyldiimidazolmethode[17,159]. Alle genannten Methoden beruhen auf einer Aktivierung der Carboxylgruppe, d.h. die nur schwach carbonylaktive Carboxylgruppe wird in ein carbonylaktivierendes Derivat, einen Ester oder ein Säureamid umgewandelt.

Bei der Carbodiimidmethode reagiert ein N,N'-disubstituiertes Carbodiimid nach Protonierung zunächst mit dem Carboxylatanion unter Bildung eines O-acylierten Harnstoffs. Dieser reagiert dann mit der nukleophilen Aminogruppe unter Ausbildung einer Peptidbindung. Letztlich ist das Carbodiimid als ein starkes Kondensationsmittel, das zum Harnstoffderivat reagiert, wenn es der Carboxyl- und der Aminogruppe ein Mol Wasser entzieht. Diese Reaktion kann paradoxerweise auch in wässriger Lösung durchgeführt werden. Es findet dann ein wasserlösliches Derivat z.B. N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid Verwendung.

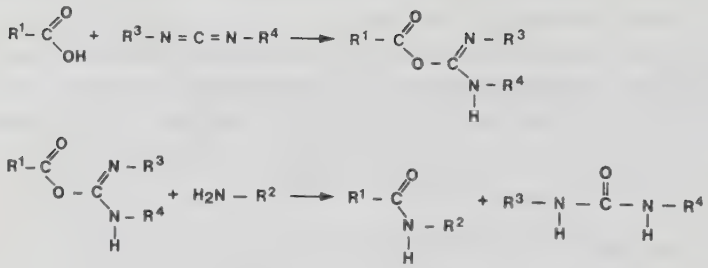
Bei der Anhydridmethode wird ein Kohlensäurehalbesterchlorid z.B. Chlorkohlensäureisobutylester unter Feuchtigkeitsausschluß mit der Carbonsäure zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Die Acylierung der freien Aminogruppen des Proteins erfolgt dann in wässrigem Milieu. Kohlensäurehalbester haben hierbei den Vorteil, daß sie sich nach erfolgter Acylierung zu CO_2 und dem entsprechenden Kohlenwasserstoff zersetzen.

Bei der Methode der aktivierten Amide wird N,N'-Carbonyldiimidazol als Reagens eingesetzt. Es reagiert mit der Carbonsäure in wasserfreiem Medium unter Abspaltung von CO_2 und einem Mol Imidazol zum aktivierten disubstituierten Amid, das dann mit der Aminokomponente unter Abspaltung eines weiteren Mols Imidazol zum Peptidderivat kuppelt. Auch diese zweite Reaktionsstufe kann in wässrigem Milieu durchgeführt werden.

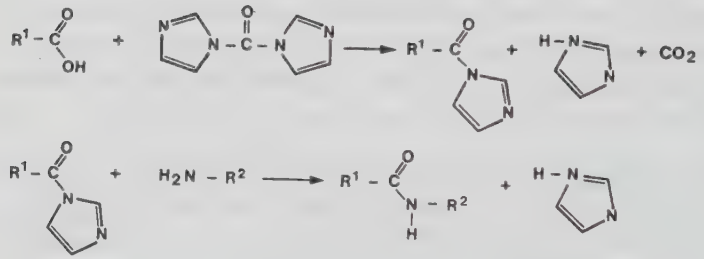
Das Molverhältnis Carboxylkomponente zu Protein im Reaktionsansatz richtet sich nach der Zahl der reaktiven Aminogruppen im Protein. Rinderserumalbumin hat ein Molekulargewicht von 69 000. Das Protein hat 59 Lysinreste, von denen im nativen Molekül, wegen der Tertiärstruktur, nur etwa 35 einer chemischen Reaktion zugänglich sind. Rao et al.[150] setzen bei ihren Reaktionsansätzen nur 1/50 Mol Rinderserumalbumin pro Mol Steroidcarbonsäure ein; sie rechnen also mit 50 reaktiven Lysinresten, bzw. setzen einen Überschuß der Carboxylkomponente ein.

Auch die in dieser Arbeit nach der Carbonyldiimidazol- und der Anhydridmethode durchgeführten Ansätze werden ebenfalls mit dem Molverhältnis 1 Steroidmolekül zu 50 Lysinresten durchgeführt. Das bedeutet in der Praxis, daß für 0.1 mM Steroidcarbonsäure 0.002 mM Rinderserumalbumin einzusetzen sind. Bei der Carbodiimidmethode wird mit einem Verhältnis von etwa 1 Steroidmolekül zu 84 Lysinresten gearbeitet.

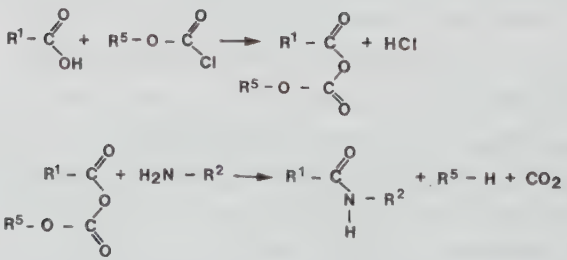
Carbodiimid:



Imidazolid:



Anhydrid:



R^1 = Steroid

R^2 = Rinderserumalbumin

R^3 = C_2H_5

R^4 = $(CH_3)_2NC_3H_5$

R^5 = $i\text{-}C_4H_9$

1.2. Die Analyse der Konjugate

Der Erfolg der Kupplungsreaktion läßt sich aus der mittleren Anzahl der gebundenen Carbonsäurederivate pro Proteinmolekül ablesen. Diese kann nach verschiedenen Methoden bestimmt werden. Nach einer indirekten Methode werden die nicht acylierten freien Aminogruppen im Konjugat nach Moore und Stein[160] mit Ninhydrin bestimmt. Verwendet man zur Aktivierung aber einen Überschuß an Chlorameisensäurehalbester, so können zusätzliche Aminogruppen statt mit dem Steroidcarbonsäureanhydrid mit dem Halbester acyliert werden. Diesem Nachteil kann man dadurch begegnen, daß der Überschuß des Halbesters nach erfolgter Aktivierung im Vakuum entfernt wird[18].

Bei der Analyse von künstlichen Antigenen mit 4-En-3-ketosteroiden wird vor allem die direkte UV-Methode nach Erlanger et al.[156] angewandt. Hierbei wird die Differenz der UV-Spektren des Konjugats und des Rinderserumalbumins ermittelt. Das kann numerisch geschehen wie bei Erlanger et al.; dabei werden die einzelnen Meßpunkte im Bereich des Absorptionsmaximums des Steroidrestes voneinander substrahiert. Man erhält dann eine Differenzkurve.

Wenn das Maximum des Steroidanteils bei etwa 240 nm liegt, wird es vom steilen Absorptionsanstieg des Rinderserumalbumins in diesem Bereich überlagert und ist dann nur als Schulter im Spektrum zu erkennen. In dieser Arbeit wird daher das UV-Spektrum des in tris-Chloridpuffers gelösten Konjugats gegen einer Rinderserumalbuminlösung, mit entsprechender Konzentration in der Referenzküvette, gemessen. Mit dieser Methode erhält man direkt die Absorptionskurve der gebundenen Steroidreste mit deutlich ausgeprägtem Maximum und tiefen Minima. Die Abb. 74 zeigt die Absorptionsspektren von zwei untersuchten Konjugaten einmal gegen Puffer (0.05 m tris-Chlorid pH 8.5) zum andern gegen Serum-

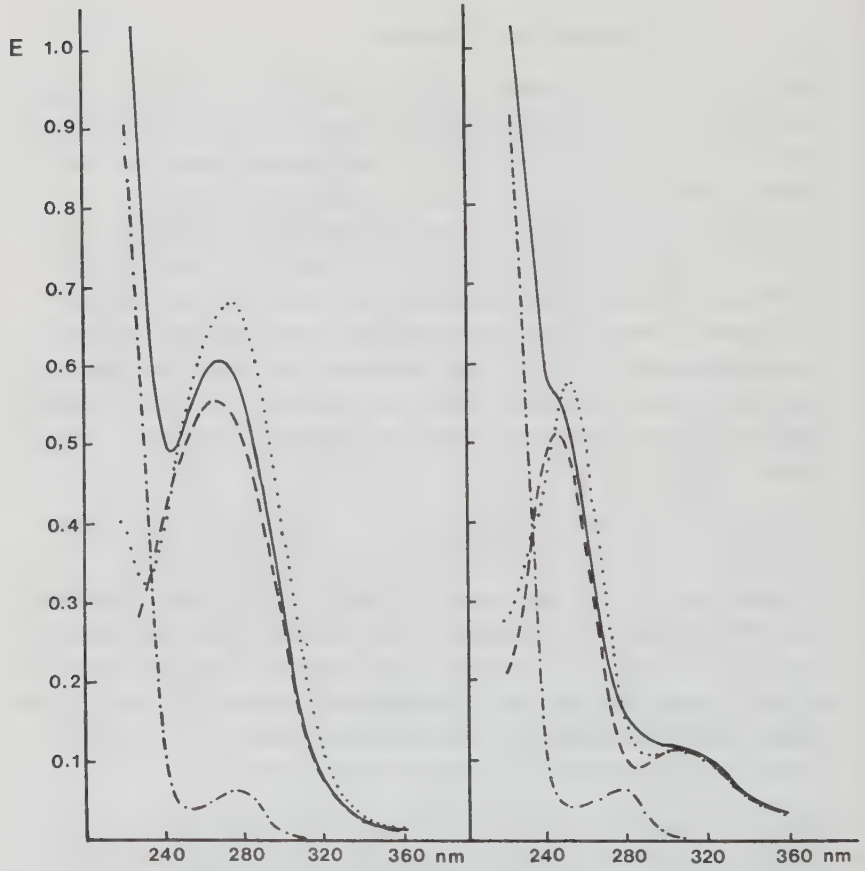


Abb. 74: UV-Absorptionsspektren von Steroidcarbonsäure-Rinderserumalbumin-Konjugaten; links: Testosteron-6-methyliden-carbonsäure (23)-RSA; rechts: Progesteron-4-thioenol-ethercarbonsäure (2)-RSA.

—— Konjugat gemessen gegen 0.05 m tris-Chlorid-Puffer pH 8.5

--- Konjugat gemessen gegen RSA in Puffer

··· Testosteroncarbonsäure 23 bzw. Progesteroncarbonsäure 2 gemessen gegen Puffer

·-·- Rinderserumalbumin (RSA) gemessen gegen Puffer; Konzentration: jeweils 100 mg/l

albumin im selben Puffer gemessen. Außerdem die Spektren der zugehörigen Steroidcarbonsäure, gelöst in Puffer, gegen Puffer gemessen.

Beim ungebundenen Progesteron-4-thioenolethercarbonsäurederivat liegt das Extinktionsmaximum bei 252 nm, im Konjugat aber bei 245 nm, beide in 0.05 m tris-Chloridpuffer pH 8.5 gemessen. Es erfolgt also ein hypsochrome Verschiebung um 7 nm. Um zu kontrollieren, ob die Verschiebung von der chemischen Bindung des Steroidrestes an das Protein abhängig ist, wird das Steroidcarbonsäurederivat im Gemisch mit Rinderserumalbumin gemessen. Wie erwartet liegt das Absorptionsmaximum bei 252 nm.

Das Testosteron-6-methylidencarbonsäurederivat hat ein Maximum bei 275 nm, im Konjugat liegt das Maximum bei 265 nm; das entspricht einer Verschiebung von 10 nm in den kurzwelligen Bereich.

Ob diese Blauverschiebung mit einem hyperchromen oder hypochromen Effekt, also einer Intensitätserhöhung oder -erniedrigung der UV-Absorption verbunden ist, kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden.

Aus der Extinktion des Konjugats im Maximum und der in Pufferlösung gemessenen Molextinktion des Steroidcarbonsäurederivates können dann die Mole Steroid pro Mol Serumalbumin berechnet werden. Das soll am Beispiel des Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure-Rinderserumalbuminkonjugats, synthetisiert nach der Anhydridmethode, gezeigt werden.

Die Molextinktion des Progesteron-4-thioenolethercarbonsäurederivates in Puffer beträgt 11 700. Das Konjugat hat bei einer Konzentration von 100 mg/l eine Extinktion von 0.512. Die Mole Steroid pro Liter sind dann $0.512 : 11\,700 = 43.7 \cdot 10^{-6}$. Mit dem Molgewicht von 418 multipliziert er-

geben sich 18.27 mg/l. Wird die Menge des Steroids von 100 mg Konjugat substrahiert, so ergeben sich 81.73 mg Rinderserumalbumin pro Liter. Die Mole Rinderserumalbumin pro Liter im Konjugat sind dann $81.73 \cdot 10^{-3}$ g : 69 000 = $1.19 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. Die Zahl der Steroidreste pro Mol Serumalbumin beträgt dann $43.7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l : $1.19 \cdot 10^{-6}$ Mol/l = 36.9.

Das Konjugat enthält also im Mittel 37 Mol Progesteron-4-thioenolethercarbonsäurereste pro Mol Rinderserumalbumin. Wird dasselbe Konjugat nach der Carbodiimidmethode hergestellt, enthält es im Mittel nur 7 Mol Steroidcarbonsäurereste pro Mol Serumalbumin. Wenn man das Testosteron-6-methylidencarbonsäure-Konjugat nach der gemischten Anhydrid-Methode synthetisiert, enthält es im Mittel 33 Mol Steroidcarbonsäurereste pro Mol Serumalbumin. Dasselbe Konjugat nach der Carbonyldiimidazolmethode dargestellt, enthält im Mittel nur 4.7 Steroidcarbonsäurereste pro Mol Serumalbumin.

Von den drei untersuchten Kupplungsmethoden liefert also die Anhydridmethode die größte Anzahl an gebundenen Steroidmolekülen im Konjugat. Schon Milewich et al.[161] haben ähnliche Verhältnisse beim Vergleich der Carbodiimid- und der Anhydridkupplung gefunden. Bei Rao et al.[17] ist die Carbonyldiimidazolmethode der Anhydridmethode gleichwertig.

1.3. Der Radioimmunoassay von 5α-Pregnan-3,20-dion mit einem Antiserum gegen Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure (2)-Rinderserumalbumin-Konjugat

Untersuchungen von M. Zwirner et al. in der Frauenklinik der Universität Tübingen zeigen, daß das Antiserum gegen das Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure-Konjugat, das nach der Carbodiimidmethode synthetisiert worden ist und

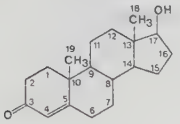
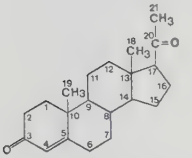
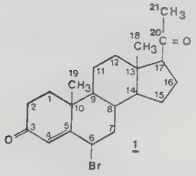
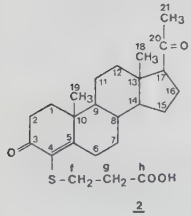
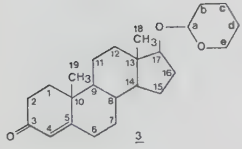
und im Mittel 7 Steroidcarbonsäurereste pro Mol Rinderserumalbumin enthält, sich für eine radioimmonologische Bestimmung von 5α-Pregnan-3,20-dion (Dihydroprogesteron) eignet[162]. Das ist durch die hohe Kreuzreaktion (90.7 %) dieses Antiserums mit diesem Steroid möglich, das sich nur durch das Fehlen der C4-C5-Doppelbindung von Progesteron unterscheidet (siehe Tab. 58). Schon Lindner et al.[11] finden eine mehr als 100 %ige Kreuzreaktion mit 5α-Pregnan-3,20-dion und eine fast gleich große Kreuzreaktion mit 5β-3,20-dion. Letztere wird von der Tübinger Gruppe allerdings nicht gefunden. Bei Verwendung des 11α-Hydroxybernsteinsäurehalbesterderivates von Progesteron als Hapten findet die Lindnergruppe nur eine geringe Kreuzreaktion mit 5α-Pregnan-3,20-dion.

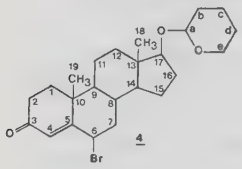
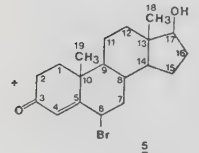
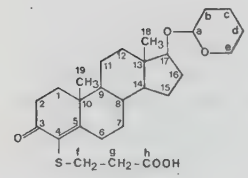
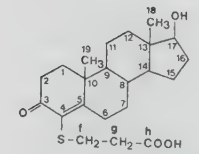
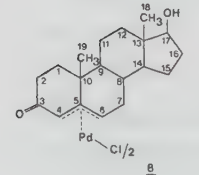
Die geringe Spezifität eines Antiserums gegen ein an C4 vinylisch substituiertes 4-En-3-ketosterid dürfte durch die direkte Nähe des Substituenten zur Doppelbindung und durch den geringen Abstand des Steroids zum Protein bedingt sein, die beide eine Abschirmung der C4-C5-Doppelbindung zur Folge haben, so daß diese vom Immunsystem nicht mehr spezifisch erkannt werden kann. Auch die oben erwähnte Verschiebung des UV-Absorptionsmaximums in den kurzwelligen Bereich und die früher[12] gefundene Vorzeichenumkehr des Cottoneffektes beim Circulardichroismus des Konjugats im Vergleich zur Steroidcarbonsäure weisen auf eine Steroid-Protein-Wechselwirkung hin.

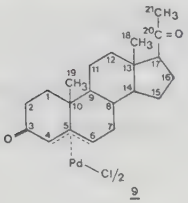
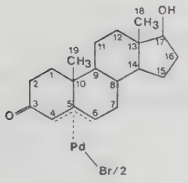
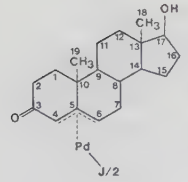
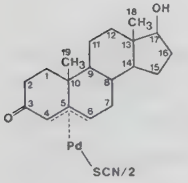
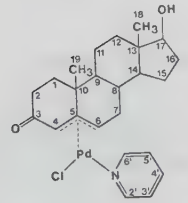
Tab. 58: Kreuzreaktionsdaten des Antiserums gegen das Progesteron-4-thioenolethercarbonsäure-Rinderserumalbuminkonjugat mit verschiedenen Steroiden nach Zwirner et al.[162)]

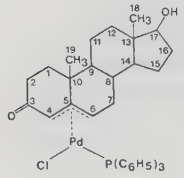
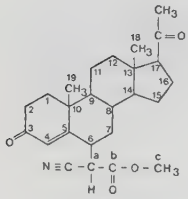
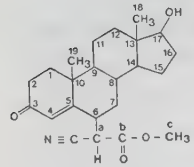
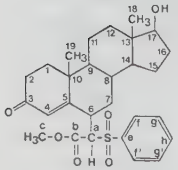
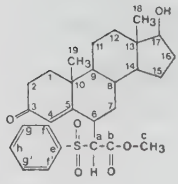
Hormon	Kreuzreaktion (%)
Progesteron	100.0
4-Pregnen-11β, 17α, 21-triol-3,20-dion	0
4-Pregnen-16α-ol-3,20-dion	0
4-Pregnen-21-ol-3,20-dion	26.5
4-Pregnen-17α, 21-diol-3,20-dion	10.6
4-Pregnen-20β-ol-3-on	15.9
4-Pregnen-11β-ol-3,20-dion	20.3
4-Pregnen-11α-ol-3,20-dion	29.0
4-Pregnen-20α-ol-3-on	7.9
5α-Pregnan-3β-ol-20-on	39.2
5α-Pregnan-3,20-dion	90.7
5β-Pregnan-3,20-dion	1.8
4-Androsten-17β-ol-3-on	5.3
4-Androsten-3,17-dion	0
4-Androsten-17α-ol-3-on	4.7
5α-Androstan-3α, 17β-diol	3.2
5α-Androstan-3β, 17β-diol	0
5α-Androstan-17β-ol-3-on	6.4
5α-Androstan-3,17-dion	4.2
5α-Androstan-3β, 17α-diol	5.3
Östron	0
Östradiol	4.7
Östriol	0

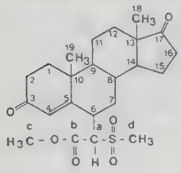
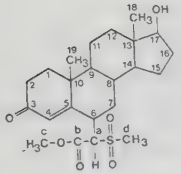
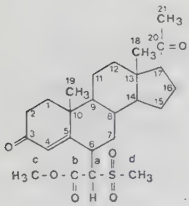
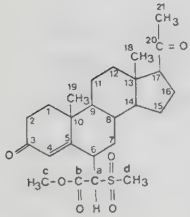
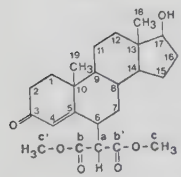
Liste der synthetisierten Steroidderivate

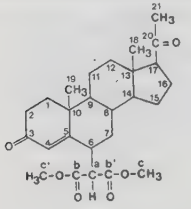
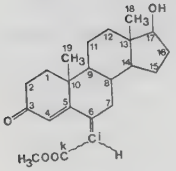
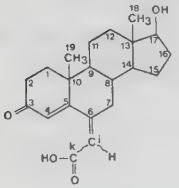
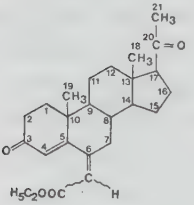
	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
		Testo	17β-Hydroxyandrost-4-en-3-on = Testosteron
		Prog	Pregn-4-en-3,20-dion = Progesteron
	1	6βBrProg	6β-Brom-pregn-4-en-3,20-dion
	2	4-TEE-Prog	3-(3,20-Dioxo-pregn-4-en-4-yl-mercapto)propionsäure
	3	THP-Testo	17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on

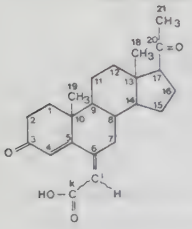
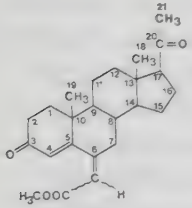
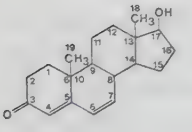
	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
	4	6βBrTHP-Testo	6β-Brom-17β-(tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on
	5	6βBrTesto	6β-Brom-17β-hydroxyandrost-4-en-3-on
	6	4-TEE-THP-Testo	3-(17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)-3-oxoandrost-4-en-4-ylmercapto)propionsäure
	7	4-TEE-Testo	3-(17β-hydroxy-3-oxoandrost-4-en-4-ylmercapto)propionsäure
	8	TestoPdCl	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid)

	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
 9	9	ProgPdCl	Bis(3,20-Dioxo-pregnen-(4-6η)α-yl-palladiumchlorid)
 10	10	TestoPdBr	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η) α-ylpalladiumbromid)
 11	11	TestoPdJ	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η) α-ylpalladiumjodid)
 12	12	TestoPdSCN	Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η) α-ylpalladiumthio-cyanat)
 13	13	TestoPdClPyr	17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η)α-yl-palladiumchlorid-pyridin

	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
 14	14	TestoPdClTPP	17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η) α-ylpalladiumchlorid-triphenylphosphin
 15	15	CEMP	(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(cyan)essigsäure-methylester
 16	16	CEMT	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-yl) (cyan)essigsäure-methylester
 17A	17A	PSET/A	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-yl) (phenylsulfonyl)essigsäure-methylester
 17B	17B	PSET/B	(17-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-yl) (phenylsulfonyl)essigsäure-methylester

	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
 18/1	18/1	MSET/1	(3,17-Dioxoandrost-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester
 18/2	18/2	MSEP/1	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester
 19/1	19/1	MSEP/2	(17α-Acetyl-3-oxo-androst-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester
 19/2	19/2		(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester) = 17β-Acetyl-3-oxo-androst-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester
 20	20	MMT	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-yl)malonsäure-dimethylester

	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
 21	21	MMP	(3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)malonsäure-dimethylester
 22	22	MCMT	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6β-methyliden)carbonsäure-methylester
 23	23	MCT	(17β-Hydroxy-3-oxo-androst-4-en-6-methyliden)carbonsäure
 24	24	MCEP	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbonsäure-ethylester

	Nr.	Abkürzung	Nomenklaturbezeichnung
 25	25	MCP	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden) carbonsäure
 26	26	MCMP	(3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden) carbonsäure-methylester
 27	27	Dehydrotesto	17β-Hydroxyandrost-4,6-dien-3-on

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Chemikalien

Testosteron und Progesteron werden freundlicherweise von der Fa. Schering AG. Berlin/Bergkamen zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Chemikalien werden von der Fa. EGA-Chemie, Steinheim,geliefert: 2,3-Dihydro-4H-pyran, N-Bromsuccinimid, Cyanessigsäuremethylester, Methylsulfonylacetonitril, Phenylsulfonylacetonitril, Phenylmercaptoessigsäure, Tributylamin, Chlorameisensäureisobutylester; folgende von der Fa. Fluka AG, Buchs: Palladiumchlorid, Malonsäuredimethylester und 1,1'-Carbonyldiimidazol; folgende von der Fa. Merck, Darmstadt: Azobisisobutyronitril, 3-Mercaptopropionsäure, 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat, Natriumhydrid mit 20 % Paraffinöl, N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, sowie weitere Grundchemikalien und Lösungsmittel.

2,3-Dihydro-4H-pyran wird über KOH unter Stickstoff, Dimethylsulfoxid über Calciumhydrid, Ethylacetat über Calciumchlorid destilliert. Dioxan und Tetrahydrofuran werden, nach Vorreinigung über KOH,über eine Aluminiumoxidsäule zum Entfernen des restlichen Peroxids und Wassers geschickt. Dioxan wird dann in festem Zustand bei $-5^{\circ}C$, Tetrahydrofuran bei $-40^{\circ}C$ aufbewahrt. Diethylether wird über $CaCl_2$ getrocknet und destilliert, dann ebenfalls über eine Aluminiumoxidsäule gereinigt. Ethanol wird mit Magnesiumethylat absolutiert.

2. Chromatographische Methoden

2.1. Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionsansätze und die isolierten Substanzen werden mit Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von 5 x 10 cm DC-Fertigplatten 60 F 254 der Fa. Merck, Darmstadt, untersucht. Wenn die Substanzen bei einem Lauf (9 cm Laufstrecke) nicht genügend getrennt sind, wird mehrmals im gleichen System entwickelt.

Folgende Fließmittelsysteme finden Verwendung:

A: Chloroform:Ethylacetat = 1:1
B: Chloroform:Acetonitril = 95:5[163)]
C: n-Hexan:Ethylacetat = 2:3
D: Ethylacetat
E: Benzol:Ethylacetat:Eisessig = 4:20:0.25[161)]
F: Chloroform:Ethanol:Eisessig = 92:8:1[164)]
G: Chloroform:Methanol 2:1

Die Substanzen werden i.a. durch Fluoreszenzlöschung im kurzwelligen ultravioletten Licht nachgewiesen. In Ausnahmefällen wird mit einem Anisaldehyd-Reagens besprüht und anschließend auf 100°C bis zur maximalen Farbintensität erwärmt oder zum Nachweis von 4-En-3-ketosteroiden mit einem Isonikotinsäurehydrazidreagens besprüht, bei Raumtemperatur getrocknet und die gelbe Fluoreszenz im langwelligen ultravioletten Licht beobachtet[165)].

2.2. Präparative Schichtchromatographie

Für die präparative Schichtchromatographie werden 20 x 20 cm Kieselgel Dickschichtplatten mit Fluoreszenzindikator für 254 nm der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Nach der Trennung werden die UV-positiven Banden mit dem Spatel von der Platte

gekratzt, das Adsorbens wird im Mörser fein pulverisiert, in eine Säule gefüllt und die Substanzen mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Dabei wird darauf geachtet, daß das Elutionsmittel nicht zu stark polar ist, da sonst anorganisches Material (Kieselgel, Calciumsulfat, Fluoreszenzindikator) mit eluiert wird. Andererseits muß das Lösungsmittel so polar sein, daß die Substanzen vom Adsorbens desorbiert werden.

2.3. Trockensäulenchromatographie

Für die Trockensäulenchromatographie nach Loev und Goodman[66] wird Kieselgel zur Trockensäulenchromatographie Aktivität III/30 mm nach Brockmann und Schodder mit 0.5 % anorganischem Fluoreszenzindikator für 254 nm der Fa. Woelm, Pharma GmbH u. Co.,Eschwege in einen unten verschlossenen und mit einem Glaswollepropfen versehenen Nylonschlauch gefüllt; dabei wird die Säule zum dichteren Packen immer wieder auf den Boden gestampft. Um den Austritt von Luft während der Chromatographie zu ermöglichen, werden in den mit Glaswolle gefüllten unteren Teil der Säule Löcher gestochen. Nach dem Auftragen der Substanzlösung auf das obere Säulenende erfolgt die Entwicklung mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch aus einem oben geschlossenen Schütteltrichter. Wenn die Lösungsmittelfront das untere Säulenende erreicht hat, wird die Säule unter dem UV-Licht betrachtet und die getrennten Substanzzonen markiert. Die Säule wird dann mit der Schere in entsprechende Fraktionen zerschnitten. Die Substanzen werden nach Entfernen der Schlauchstücke mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert.

2.4. Mitteldruckflüssigkeitschromatographie

Die Mitteldruckflüssigkeitschromatographie erfolgt auf Lobar-Fertigsäulen Größe B der Fa. Merck Darmstadt, die entweder mit LiChrosorb Si60 (Kieselgel) oder LiChrosorb RP-8 (reversed phase) gefüllt sind. Für Trennungen auf Kieselgel LiChrosorb Si60 werden zwei Säulen hintereinander geschaltet. Die Probe wird mittels eines in der Institutswerkstatt angefertigen Probenauftragventils, an das eine Probenschleife mit 2 ml Volumen angeschlossen ist, auf die Säule gebracht. Substanzgemisch und Elutionsmittel werden mittels einer CFG-Membranpumpe ProMinent electronic Typ A 2001 der Fa. Chemie und Filter GmbH, Verfahrenstechnik KG., Heidelberg, von unten nach oben durch die Säule gepumpt. Der Druck beträgt etwa 2 Atmosphären, die Hublänge wird auf 20 Skalenteile, die Frequenz auf 40 Skalenteile eingestellt. Als Fraktionssammler werden Geräte der Firmen Isco, Modell 328 (Golden Retriever) und LKB, (UltroRac 7000) verwendet. Der Nachweis der Steroidderivate in den Fraktionen erfolgt durch Auftüpfeln einer Probe von jeder zweiten Fraktion auf eine Dünnschichtplatte mit Fluoreszenzindikator und anschließendem Betrachten im kurzwelligen ultravioletten Licht. Überlappungsfraktionen werden dünnschichtchromatographisch identifiziert.

2.5. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die HPLC-Trennungen werden Stahlsäulen (250 x 4.6 mm) verwendet. Die Kieselgelsäule ist mit Nucleosil 50-5, Korngröße 5 µm, der Fa. Macherey-Nagel, Düren, gefüllt. Eluiert wird mit Hexan:Ethylacetat = 2:3. Die Umkehrphasensäule wird von der Fa. Knauer, Oberursel, als Fertigsäule bezogen; sie ist mit LiChrosorb RP-18, Korngröße 10 µm der Fa. Merck, Darmstadt, gefüllt. Das Elutionsmittel bei allen

Trennungen ist Methanol:H_2O:Propionsäure = 70:30:0.1.

Folgende Gerätekombination wird verwendet: Eine Doppelkolbenhochdruckpumpe M 6000A der Fa. Waters Associates Inc., Milford, M.A./U.S.A., ein Hochdruckinjektionssystem Modell 7125 der Fa. Rheodyne, Berkely, Calif./U.S.A., ein UV/VIS-Zweistrahlphotometer mit variabler Wellenlänge Uvikon LCD 725 der Fa. Kontron, Eching bei München und als Schreiber den Recorder 56 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen.

Die Chromatographie wird bei einem Druck von 120 bar (1740 psi), bei einer Durchflußrate von 2 ml/min und einer Schreibergeschwindigkeit von 5 mm/min durchgeführt. Die Steroidderivate werden im UV bei einer Wellenlänge von 250 bzw. 240 nm detektiert.

3. Spektroskopische Methoden

3.1. Kernresonanzspektroskopie

Für die Kernresonanzspektroskopie werden folgende Multikern-NMR-Spektrometer der Fa. Bruker, Karlsruhe, eingesetzt: Für die ^{1}H-NMR-Spektroskopie das HFX-90-Gerät bei 90 MHz bzw. das WM-400-Gerät bei 400 MHz; für die Aufnahme der protonenbreitbandentkoppelten und der Off-resonance-^{13}C-NMR-Spektren das WP-80-Gerät bei 20.115 MHz und für die ^{13}C-NMR-Spektren nach der Spin-Echo-Methode das WM-400-Gerät bei 100 MHz.

Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (2.5 bis 3.5 µsec; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Für Off-resonance-Messungen wird die Entkopplerleistung auf 0.4 Watt eingestellt. Die Entkopplerfrequenz wird dabei um 500 Hz zu höheren Wellenlängen verschoben.

Beim frequenzmodulierten Spin-Echo-Experiment (Programm J-Mod) werden quartäre und sekundäre C-Atome mit positiver, tertiäre und primäre mit negativer Amplitude oder umgekehrt dargestellt. Beim Programm GASPE erscheinen nur für die quartären C-Atome positive Signale. Genauere Angaben über das Prinzip und die Technik der Spin-Echo-Methode findet man in der angegebenen Literatur[169].

Die Spreizung beträgt bei den ^{1}H-NMR-Spektren 20 Hz/cm, bei den ^{13}C-NMR-Spektren 125 Hz/cm. Für die Aufnahme von ^{1}H-NMR-Spektren werden 5 mg der zu messenden Substanz in ca. 0.5 ml, für die Aufnahme von ^{13}C-NMR-Spektren 80-130 mg Substanz in ca. 1 ml des entsprechenden deuterierten Lösungsmittels gelöst. Die angegebenen δ-Werte in ppm beziehen sich auf δ_{TMS} = 0.0 ppm.

3.2. Massenspektrometrie

Die Elektronenstoß-Massenspektren (MS) werden mit dem Gerät MAT 711 der Fa. Varian, Bremen, mit direktem Einlaßsystem gemessen. Die Elektronenenergie beträgt 70 eV, die Ionenquelle-Temperatur 200°C. Die Felddesorptions-Massenspektren (FD-MS) werden mit einer FD-Ionenquelle im selben Gerät aufgenommen. Die Ionenquelle-Temperatur beträgt 65°C. Als Lösungsmittel für die Steroidderivate eignen sich $CHCl_3$ und CH_2Cl_2.

3.3. Infrarotspektroskopie

Zur Aufnahme der IR-Spektren werden KBr-Preßlinge hergestellt, die 1.5 mg Substanz pro 300 mg KBr enthalten. Die Spektren werden mit den Spektrographen 2021 und 021 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen, gemessen.

3.4. Elektronenanregungsspektroskopie

Die UV/VIS-Spektren werden im Spektralphotometer Modell 24 mit angeschlossenen Schreiber der Fa. Beckman Instruments GmbH, München, in 1 cm Quarzküvetten der Fa. Hellman, Mülheim, gemessen. Die Spreizung beträgt 40 nm/inch. Zur Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten der 4-En-3-ketosteroide werden die Lösungen aus der CD-Spektroskopie (s.u.) 1:50 verdünnt. Die Konzentration beträgt dann $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter. Zur Konjugatanalyse werden die Steroidcarbonsäuren bei derselben Konzentration in 0.05 m tris/HCl-Puffer pH 8.5 gemessen.

3.5. Cirkulardichroismusspektroskopie

Die CD-Spektren werden im CD-185-Dichrograph der Fa. Roussell-Juan, Paris, gemessen. Als Lösungsmittel für die Steroidderivate wird Dioxan (wasser- und peroxidfrei), Methanol (Uvasol, Merck) oder Chloroform verwendet. Die Konzentration beträgt dabei $0.25 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter.

3.6. Drehwerte

Die Drehwerte werden im Perkin-Elmer-Polarimeter 241 in der 10 cm Küvette (ca. 5 ml Volumen) oder in der 1 cm Küvette (ca. 0.5 ml Volumen) bei der Natrium-D-Linie (589 nm) gemessen. Die Temperatur der Küvetten wird während der Messung mittels eines Thermostaten auf $+20^{\circ}C$ gehalten.

Fast alle Messungen werden bei c = 1 (10 mg Substanz/ml) durchgeführt.

4. Sonstige Methoden

4.1. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte werden mit dem Schmelzpunktbestimmungs-Apparat nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi, Flawil, Schweiz, bestimmt. Wegen der Zersetzlichkeit der untersuchten Steroidderivate bei höherer Temperatur wird das Schmelzpunktröhrchen erst etwa 20°C unterhalb der erwarteten Schmelztemperatur in das Silikonöl eingetaucht.

4.2. Feindestillation

Phenylsulfonylessigsäuremethylester wird in der Mikrospaltrohrkolonne Typ 75913 der Fa. Fischer, Meckenheim, destilliert.

4.3. pH-Messungen[170)]

pH-Messungen werden im pH-Meter E 512 mit einer Einstab-Glaselektrode EA 120 der Fa. Metrom, Herisau, Schweiz durchgeführt.

4.4. Dialyse[170)]

Die Dialyse der Steroidcarbonsäure-Rinderserumalbumin-Konjugate wird in Visking-Dialyseschläuchen, geliefert von der Fa. Serva, Heidelberg, durchgeführt.

4.5. Gefriertrocknung[170)]

Die salzfreien Konjugate werden in der Apparatur der Fa. New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick N.J./ U.S.A., gefriergetrocknet.

5. Arbeitsvorschriften

5.1. 6β-Brom-pregn-4-en-3,20-dion 1

6.3 g (20 mMol) Progesteron und 50 mg Azobisisobutyronitril werden in 100 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Nach Zugabe von 4.3 g (24 mMol) N-Bromsuccinimid wird in einem vorgeheizten Ölband 15 Minuten unter Rückfluß erhitzt. Der Reaktionsansatz wird im Eisbad rasch auf 25°C abgekühlt. Das ausgefallene Succinimid wird abgesaugt. Das Filtrat wird mit Wasser, 50 ml 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung und nochmals mit Wasser gewaschen und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals mit Ethylacetat eingedampft, in wenig Ethylacetat suspendiert, abgesaugt und mit demselben Lösungsmittel gewaschen. Ausbeute 3.6 g; aus der Mutterlauge können weitere 1.3 g Rohprodukt isoliert werden. Ausbeute: 4.9 g (62.3 %)
Das DC im System B zeigt, daß das Hauptprodukt 6β-Bromprogesteron 1 mit 6α-Bromprogesteron und Progesteron verunreinigt ist. Das Rohprodukt wird daher zweimal aus Dichlormethan/Ether kristallisiert.
Fp.: 147-149°C, Lit.[11] 145-146°C
Rf_B: 0.35
$[\alpha]_D^{20}$: +62.0° (c = 1, Dioxan)

$C_{21}H_{29}O_2Br$ (393.37)	Ber:	C 64.12	H 7.41	Br 20.31
	Gef:	C 64.15	H 7.68	Br 20.74

5.2. 3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4ylmercapto)propionsäure 2

3.9 g (10 mMol) 6β-Bromprogesteron 1 werden in 200 ml DMF gelöst. Dazu werden 5.6 ml (40 mMol) N-Triethylamin und 1.74 ml (20 mMol) 3-Mercaptopropionsäure zugegeben. Man läßt den Ansatz unter Stickstoff 1 Stunde bei 0°C rühren und stellt ihn in den Eisschrank. Die Aufarbeitung erfolgt nach 48 Stunden. Nach Zugabe von 2.8 ml (20 mMol) N-Triethyl-

amin wird der Ansatz zwischen Wasser und Ethyacetat verteilt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit 1 n HCl wird mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird nach dem Auswaschen mit Wasser mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Aus dem Extrakt wird das Produkt durch Ansäuern mit 1 n HCl auf pH 4 ausgefällt. Nach Absaugen und Waschen mit Wasser wird im Exsikkator über Phosphor-V-oxid im Vakuum getrocknet.
Ausbeute: 2.18 g (52.2 %)
Das Rohprodukt wird aus Hexan/Ethylacetat umkristallisiert. Aus 1 g erhält man 0.54 g reines Produkt.
Fp.: 166-169°C
Rf_F: 0.40
$[\alpha]_D^{20}$: +161.5° (c = 1, Dioxan)
$C_{24}H_{34}O_4S$ (418.60) Ber: C 68.86 H 8.19 S 7.66
Gef: C 68.93 H 8.19 S 8.50

5.3. 17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 3[13)]

20 g (69.4 mMol) Testosteron und 1 g 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat werden in 200 ml Dioxan gelöst. Innerhalb von 20 Minuten werden 20 ml (220 mMol) 2,3-Dihydro-4-pyran zugetropft. Durch gelegentliches Eintauchen in ein Eisbad wird der Reaktionsansatz während dieser Zeit auf 20°C gehalten. Nach beendeter Reaktion wird der Ansatz mit Methanol/Ammoniak auf etwa pH 8 eingestellt und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 1 Liter Chloroform gelöst. Die Lösung wird dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel eingedampft und das Produkt aus Petrolether (30/50) kristallisiert. Der Kristallbrei wird mehrmals in der Kälte mit wenig Petrolether gewaschen, um das überschüssige Reagenz zu entfernen. Das Produkt wird dann aus Petrolether um-

kristallisiert und im Exsikkator über Phosphor-V-oxid getrocknet.
Ausbeute: 20.8 g (80.6 %)
Fp.: 101-103°C, Lit.[13,171] 102-104°C
Rf_A: 0.68 (Testosteron 0.33)
$[\alpha]_D^{20}$: +76.3° (c = 1, Dioxan) Lit.[171]: $[\alpha]_D^{25}$: 75.2°
$C_{24}H_{36}O_3$ (372.55) Ber: C 77.38 H 9.74
Gef: C 78.02 H 9.92

5.4.1. 6β-Brom-17β(tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 4

7.5 g (20 mMol) 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 3 und 50 mg Azobisisobutyronitril werden in 100 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Nach Zugabe von 4.3 g (24 mMol) N-Bromsuccinimid wird 8 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wird das gebildete Succinimid abgesaugt und mit wenig Tetrachlorkohlenstoff gewaschen. Das Filtrat wird erst mit 50 ml 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen und eingedampft. Der Rückstand wird erst mehrmals mit Tetrachlorkohlenstoff, dann mehrmals mit Ethylacetat eingedampft, bis Kristallisation eintritt. Der Kristallbrei wird in wenig Ethylacetat bei Raumtemperatur suspendiert, abgesaugt und mit wenig Ethylacetat gewaschen.
Ausbeute: 3.9 g (43.2 %)

Da das Rohprodukt noch eine geringe Menge Ausgangsprodukt, α-Isomeres und 6β-Bromtestosteron 5 enthält, wird es aus Ethanol bei Raumtemperatur durch Lösen und Einengen umkristallisiert. Aus 2 g Rohprodukt erhält man 0.4 g reines Produkt.
Fp.: 122-124°C
Rf_B: 0.41
$[\alpha]_D^{20}$: +43.0° (c = 1, Dioxan)
$C_{24}H_{35}O_3Br$ (451.45) Ber: C 63.86 H 7.81 Br 17.70
Gef: C 63.87 H 7.87 Br 18.44

5.4.2. Alternative Darstellung von 6β-Brom-17β(tetrahydro-2-pyranyloxy)androst-4-en-3-on 4 zur Gewinnung des Nebenprodukts 6β-Brom-17β-hydroxyandrost-4-en-3-on 5

11.2 g (30 mMol) 17-O-Tetrahydropyranyltestosteron 3 und 72 mg Azobisisobutyronitril werden in 300 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Nach Zugabe von 5.4 g (30 mMol) N-Bromsuccinimid wird 6 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das gebildete Succinimid abgesaugt. Das Filtrat wird eingedampft. Der Rückstand wird mehrmals mit absolutem Ether eingedampft, bis das Produkt kristallisiert. Die Kristalle werden mit wenig Ether bei 0°C auspendiert, abgesaugt und mit wenig kaltem Ether gewaschen. Aus Mutterlauge und Waschflüssigkeit kann durch Einengen eine weitere Kristallfraktion erhalten werden. Diese Prozedur wird noch zweimal wiederholt. Die ersten beiden Kristallfraktionen sind reines 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4.
Ausbeute: 2.1 g (15.5 %)

Zwei weitere Kristallfraktionen sind 6β-Bromtestosteron 5
Ausbeute: 0.5 g (5.8 %)

Fp.: 135-137°C (Zers.) Lit.[28] 128-131°C
Rf_B: 0.17
$[\alpha]_D^{20}$: +5.0 (c = 1, Dioxan)
$C_{19}H_{27}O_2Br$ (367.34) Ber: C 62.13 H 7.41 Br 21.75
Gef: C 62.08 H 7.62 Br 21.47

5.5. 3-(17β-(Tetrahydro-2-pyranyloxy)-3-oxoandrost-4-en-4ylmercapto)propionsäure 6

1.13 g (2.5 mMol) 6β-Brom-17-O-(tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 4 werden in 80 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Dann werden unter Stickstoff 0.44 ml (5 mMol) 3-Mercaptopropionsäure und 1.4 ml (10 mMol) Triethylamin zugegeben. Nach

dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Ansatz in Eis/Wasser gegossen und mit 7 ml 1 n HCl angesäuert. Das ausgefallene Carbonsäurederivat wird abgesaugt und mit viel kaltem Wasser gewaschen. Das feuchte Produkt wird in Ethylacetat gelöst. Nach Zusatz von Ethanol wird bei Raumtemperatur eingedampft. Es wird noch mehrmals mit Ethanol, dann mehrmals mit Ethylacetat eingedampft bis das Produkt kristallisiert.
Ausbeute: 0.45 g.
Aus der Mutterlauge lassen sich noch weitere 0.14 g Produkt isolieren.
Gesamtausbeute: 0.59 g (49 %)

Für analytische Untersuchungen wird das Rohprodukt nochmals aus Ethylacetat bei Raumtemperatur umkristallisiert. Aus 0.4 g Rohprodukt erhält man 0.2 g reines Produkt.

Fp.: 153-155°C
Rf_F: 0.43
$[\alpha]_D^{20}$: +159.7 (c = 1, Dioxan)
$C_{27}H_{40}O_5S$ (476.68) Ber: C 68.03 H 8.46 S 6.73
Gef: C 67.89 H 8.54 S 6.08

5.6. 3-(17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-4-ylmercapto) propionsäure 7 (Abspaltung der THP-Schutzgruppe nach Lit.[13])

0.4 g (0.89 mMol) THP-Testosteron-4-S-mercaptopropionsäure 2 werden unter Stickstoff in 20 ml Ethanol unter Zusatz von 0.2 ml 0.1 n HCl 30 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz bei Raumtemperatur eingedampft. Der Rückstand wird dann mehrmals mit Ethanol, dann mehrmals mit Ethylacetat eingedampft, bis das Produkt kristallisiert. Die Kristalle werden in wenig Ethylacetat suspendiert, abgesaugt, und mit wenig Ethylacetat gewaschen. Die Ausbeute beträgt 240 mg. Aus der Mutterlauge

können weitere 28 mg Produkt gewonnen werden.
Ausbeute: 268 mg (77 %)

Fp.: 174-176°C
Rf_F: 0.36
$[\alpha]_D^{20}$: +115° (c = 1, Dioxan)

$C_{22}H_{32}O_4S$ (392.56)	Ber:	C 67.31	H 8.22	S 8.17
	Gef:	C 67.39	H 8.42	S 7.92

5.7.1. Versuch zur Synthese von Bis(17β-Hydroxy-3-oxo-androsten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8 aus Dibenzonitrilpalladiumchlorid

0.38 g (1 mMol) Dibenzonitrilpalladiumchlorid werden in 18 ml Benzol gelöst. Zu dieser Lösung gibt man eine Lösung von 0.58 g (2 mMol) Testosteron in 13 ml Benzol und kocht unter Rückfluß. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung im System D nach 20 Stunden Reaktionsdauer zeigt, daß der π-Allylkomplex gebildet wird. Im Reaktionsansatz sind aber noch eine beträchtliche Menge Olefinkomplex und viele Nebenprodukte vorhanden.

5.7.2. Dibenzonitrilpalladiumchlorid[71)]

0.89 g (5 mMol) Palladiumchlorid werden bei 100°C in insgesamt 20 ml (5.1 mMol) Benzonitril gelöst. Nach Abkühlen auf -5°C fällt das Produkt aus. Die Kristalle werden mit Petrolether (30/50) gewaschen. Nach Überschichten der Mutterlauge mit Petrolether läßt sich bei -20°C eine weitere Kristallfraktion gewinnen.
Ausbeute: 1.39 g (72.5 %; bezogen auf $PdCl_2$)

$C_{14}H_{10}Cl_2N_2Pd$ (383.56)	Ber:	C 43.84	H 2.63	N 7.30	Cl 18.49
	Gef:	C 44.23	H 2.62	N 7.36	Cl 18.94

5.8. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung von π-Allylpalladiumchloridkomplexen aus 4-En-3-ketosteroiden

60 mMol 4-En-3-ketosteroid werden in 100 ml Tetrahydrofuran gelöst. Zu dieser Lösung werden 7.2 g (40 mMol) Palladiumchlorid und 9.2 g (160 mMol) fein pulverisiertes Natriumchlorid gegeben. Der Reaktionsansatz wird unter kräftigem Rühren 2 Tage unter Rückfluß gekocht. Nach Filtration des Reaktionsansatzes und Eindampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt. Die Ethylacetatphase wird noch zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat filtriert und eingedampft. Nach mehrmaligem Eindampfen mit Ethylacetat wird der Rückstand in Ethylacetat gelöst und das Produkt mit n-Hexan ausgefällt. Zum Entfernen des überschüssigen 4-En-3-ketosteroids wird das Präzipitat mehrmals mit n-Hexan gewaschen. Das Lösen, Ausfällen und Auswaschen des Produkts wird nochmals wiederholt.

5.8.1. Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid) 8

Es werden 17.3 g (60 mMol) Testosteron und 7.2 g (40 mMol) $PdCl_2$ eingesetzt. Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat bei $-20^{\circ}C$ kristallisiert. Die großen lösungsmittelhaltigen Kristalle zerfallen beim Absaugen zu einem gelben mikrokristallinen Pulver.

Ausbeute: 16.5 g (96.5 %, bezogen auf $PdCl_2$)

Fp.: 208-210°C (Zers.) Lit.[15]: 188-190°C

Rf_D: 0.18; Rf_D rel. Testo: 0.42; Rf_D Testo 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: +294.3° (c = 1, Dioxan)

$[\alpha]_D^{20}$: +305.7° (c = 1, Chloroform)

Lit.[15]: $[\alpha]_D$: +320° (c = 0.36, Ethanol)

Lit.[73]: $[\alpha]_D$: +218°

$C_{38}H_{54}Cl_2O_4Pd_2$ (858.56) Ber: C 53.16 H 6.34 Cl 8.26

Gef: C 53.24 H 6.37 Cl 8.25

5.8.2. Bis(3,20-Dioxopregnen(4-6η)α-ylpalladiumchlorid 9

Es werden 18.8 g (60 mMol) Progesteron und 7.2 g (40 mMol) $PdCl_2$ eingesetzt.
Ausbeute: 16.5 g (90.5 % bezogen auf $PdCl_2$)

Das Rohprodukt wird aus Hexan/Ethylacetat kristallisiert.

Fp.: 213-216°C Lit.[15] 163-165°C
Rf_D: 0.48; Rf_D: rel. Prog 0.84; Rf_D: Prog 0.57
$[\alpha]_D^{20}$: +348.0° (c = 1, Dioxan)
$[\alpha]_D^{20}$: + 346.3° (c = 1, Chloroform)
Lit.[15]: $[\alpha]_D$: +328° (c = 0.53, Chloroform)
Lit.[73]: $[\alpha]_D$: +348°

$C_{42}H_{58}Cl_2O_4Pd_2$ (911.68) Ber: C 55.33 H 6.41 Cl 7.89
Gef: C 55.79 H 6.66 Cl 8.02

5.9. Allgemeine Arbeitsvorschrift für den Halogen- bzw. Pseudohalogenaustausch beim Testosteron-π-allyl-palladiumchloridkomplex 8

0.5 mMol dimerer Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex werden in 2 ml Aceton gelöst. Dazu gibt man 2 Äquivalente, also 2 mMol des entsprechenden Alkalisalzes gelöst in 2 ml Aceton. Man läßt 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen und gießt dann den Ansatz in 100 ml Wasser. Der ausgefallene dimere Komplex wird abgesaugt, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Calciumchlorid im Vakuum getrocknet.

5.9.1. Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumbromid) 10

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden mit 174 mg (2 mMol) Lithiumbromid zur Reaktion gebracht. Aus der kirschroten acetonischen Reaktionslösung wird ein

dunkelgelbes Rohprodukt isoliert.
Ausbeute: 0.48 g (100 %)

Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat kristallisiert.

Fp.: 209-210°C (Zers.)
Rf_D: 0.19
$[\alpha]_D^{20}$: +329° (c = 1, Dioxan)

$C_{38}H_{54}Br_2O_4Pd_2$ (947.47) Ber: C 48.17 H 5.74 Br 16.87
Gef: C 48.01 H 6.00 Br 15.89

5.9.2. Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladium-jodid) 11

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden mit 300 mg (2 mMol) Natriumjodid zur Reaktion gebracht. Bei der Reaktion bildet sich Natriumchlorid unter Wärmeentwicklung. Der entstehende Komplex ist dunkelrot-braun in acetonischer Lösung.
Ausbeute: 0.5 g (96.2 %)

Das Rohprodukt wird aus Ethylacetat kristallisiert.

Fp.: 187-189°C
Rf_D: 0.20
$[\alpha]_D^{20}$: +500° (c = 1, Dioxan)

$C_{38}H_{54}J_2O_4Pd_2$ (1041.46) Ber: C 43.82 H 5.23 J 24.37
Gef: C 43.92 H 5.53 J 23.74

5.9.3. Bis(17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladium-thiocyanat) 12

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden mit 194 mg (2 mMol) Kaliumthiocyanat zur Reaktion gebracht. Beim Eingießen der acetonischen Lösung in Wasser bildet sich eine zitronengelbe kolloidale Lösung, aus der

erst bei 0°C über Nacht ein gallertiger Niederschlag ausfällt.

Ausbeute: 0.4 g (88.5 %)

Fp.: Zersetzung bei 238°C

Rf_D: 0.21

$[\alpha]_D^{20}$: +160° (c = 0.5, Dioxan)

$C_{40}H_{54}N_2S_2O_4Pd_2$ (903.82) Ber: C 53.16 H 6.02 N 3.10 S 7.09
Gef: C 51.95 H 6.05 N 3.52 S 6.32

5.10. Monomere Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplexe durch Behandlung des dimeren Komplexes 8 mit Basen

5.10.1. 17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladiumchlorid-pyridin 13

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden in 15 ml Chloroform gelöst; dazu werden 0.81 ml (10 mMol) Pyridin gegeben. Dabei schlägt die Farbe der Lösung von dunkelgelb nach hellgelb um. Die Lösung wird dann 4 Minuten in ein Wasserbad mit 40°C eingetaucht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird im Rotationsverdampfer eingedampft. Das zurückbleibende Öl wird mehrmals mit n-Hexan extrahiert. Dann wird es in 4 ml Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 20 ml Ethylacetat läßt man das Produkt über Nacht bei -20°C auskristallisieren.

Ausbeute: 0.28 g (55.1 %)

Fp.: 174-175°C (Zers.)

Rf_D: 0.16

$[\alpha]_D^{20}$: -44° (c = 1, Dioxan)

$C_{24}H_{32}ClNO_2Pd$ (508.38) Ber: C 56.70 H 6.34 Cl 6.97 N 2.76
Gef: C 57.04 H 6.39 Cl 7.51 N 2.44

5.10.2. 17β-Hydroxy-3-oxoandrosten-(4-6η)α-ylpalladium-chlorid-triphenylphosphin 14

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden in 2 ml Tetrahydrofuran gelöst. Dazu gibt man eine Lösung von 0.52 g (2 mMol) Triphenylphosphin in 3 ml Tetrahydrofuran. Zunächst schlägt die Farbe der Lösung nach hellgelb um, wird dann aber rasch dunkelgelb. Nach 1 1/2 Stunden wird der Ansatz aufgearbeitet. Das Produkt wird mit n-Hexan gefällt; das hellgelbe Präzipitat wird mit viel n-Hexan gewaschen. Zum Entfernen des restlichen Triphenylphosphins wird das Rohprodukt 3 mal mit Toluol extrahiert.
Ausbeute: 0.3 g (43.4 %)

Fp.: 140-142°C
Rf_D: 0.39
$[\alpha]_D^{20}$: +101° (c = 1, Dioxan)

$C_{37}H_{42}ClPO_2Pd$ (691.57) Ber: C 64.26 H 6.12 Cl 5.13
Gef: C 66.42 H 6.42 Cl 5.07

5.11. Phenylsulfonylessigsäure aus Phenylmercaptoessigsäure[129,130]

16.8 g (0.1 Mol) Phenylmercaptoessigsäure werden in 70 ml Eisessig gelöst. Dann werden 41 ml (0.4 Mol) 30 %iges Wasserstoffperoxid zugegeben. Der Ansatz wird 45 Minunten auf 70-80°C erwärmt (Geruch nach Peressigsäure!) und dann in Eis/Wasser gegossen. Das Produkt wird mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird erst mehrmals mit Wasser, dann mit gesättigter Natriumhydrogensulfitlösung so lange gewaschen, bis sich mit Kaliumjodid/Stärkepapier kein Peroxid mehr nachweisen läßt. Die Ethylacetatphase wird dann über Natriumsulfat filtriert und im Vakuum eingedampft. Zum Entfernen des restlichen Wassers wird mehrmals mit Ethylacetat eingedampft. Das ausgefallene kristalline

Produkt wird in Chloroform gelöst und nach Zugabe von Cyclohexan eingedampft. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis die restliche Essigsäure azeotrop überdestilliert ist.
Ausbeute: 18 g (90 %)

Fp.: 111-112°C
Rf_G: 0.26

Umkristallisieren des Rohprodukts aus Hexan/Ethylacetat bei -20°C führt zu keiner Erhöhung des Schmelzpunktes.

$C_8H_8O_4S$ (200.22) Ber: C 47.99 H 4.03 S 16.01
Gef: C 48.20 H 3.91 S 16.03

5.12. Phenylsulfonylessigsäuremethylester (Methode der extraktiven Veresterung)[131]

20 g (0.1 Mol) Phenylsulfonylessigsäure und 0.5 g 4-Toluolsulfonsäure werden in 20.8 ml (0.5 Mol) Methanol gelöst und mit 60 ml Tetrachlorkohlenstoff 46 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Abdampfen der Lösungsmittel im Vakuum wird der Reaktionsansatz zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt. Die Ethylacetatphase wird erst mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung, dann mit Wasser gewaschen. Nach Filtration über Natriumsulfat wird im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt, 18.7 g (87.3 %) leicht gelbstichiges Öl, wird in der Spaltrohrdestillationskolonne destilliert.
Ausbeute: 16.0 g (74.7 %) farbloses Öl.

Kp.: 160°C (0.005 Torr) Lit.[172]: 145°C (0.01 Torr)
Lit.[173]: 165°C (0.05 Torr)

Rf_G: 0.79
n_D^{21}: 1.5333 Lit.[172]: 1.5377

$C_9H_{10}O_4S$ (214.24) Ber: C 50.46 H 4.70 S 14.97
Gef: C 50.00 H 4.91 S 14.99

5.13. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Methylestern aus Nitrilen[127)]

0.05 Mol des entsprechenden Nitrils werden je nach Löslichkeit in etwa 120-160 ml (ca. 3-4 Mol) Methanol gelöst; zur Lösung werden 0.9 ml (0.05 Mol) Wasser hinzugefügt. Man leitet in die Lösung unter Rühren 4 Stunden trockenen Chlorwasserstoff ein. Der Ansatz wird durch gelegentliches Kühlen im Eisband auf Raumtemperatur gehalten. Anschließend wird 7 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das ausgefallene Ammoniumchlorid abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird zwischen Eis/Wasser und Ethylacetat verteilt. Die Ethylacetatphase wird erst mit Wasser, dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und wieder mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat filtriert und im Vakuum eingedampft. Aus dem Rückstand wird das Produkt kristallisiert oder im Vakuum destilliert.

5.13.1. Phenylsulfonylessigsäuremethylester aus Phenylsulfonylacetonitril

9 g (0.05 Mol) Phenylsulfonylacetonitril werden in 160 ml (ca. 4 Mol) Methanol gelöst. Nach der oben beschriebenen Aufarbeitung des Reaktionsansatzes erhält man nach Entfernen des restlichen Ethylacetats im Hochvakuum ein Rohprodukt, das dieselben Eigenschaften hat, wie das durch Veresterung aus Phenylsulfonylessigsäure mit Methanol erhaltene Produkt (s.o.).
Ausbeute: 9 g (84 %) fast farbloses Öl

5.13.2. Methylsulfonylessigsäuremethylester aus Methylsulfonylacetonitril

6 g (0.05 Mol) Methylsulfonylacetonitril werden in 120 ml (ca. 3 Mol) Methanol gelöst. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes kristallisiert das Produkt aus wenig Ethylacetat bei -20°C in großen Prismen aus.
Ausbeute: 5.15 g (67.8 %)

Fp.: 62-63°C

$C_4H_8O_4S$ (151.17)	Ber:	C 31.57	H 5.30	S 21.07
	Gef:	C 31.35	H 5.22	S 20.85

5.14. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die allylische Alkylierung von π-Allylpalladiumchloridkomplexen von 4-En-3-ketosteroiden[15,101)]

Zur Darstellung des Natriumsalzes des CH-aciden Esters werden 0.3 g Natriumhydrid mit 20 % Paraffinöl (≙ 10 mMol NaH) zweimal mit je 20 ml n-Pentan durch Suspendieren und Dekantieren gewaschen. Das Natriumhydrid wird im Stickstoffstrom getrocknet und in 20 ml DMSO suspendiert. Zu der Suspension werden 10 mMol des CH-aciden Esters in mehreren Portionen zugegeben. Nach beendeter Reaktion wird zur Lösung des Salzes eine Lösung von 5 mMol (≙ 10 mMol Steroid) des dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexes eines 4-En-3-ketosteroids (hier 8 bzw. 9) in 20 ml DMSO unter Stickstoff zugegeben. Der Alkylierungsansatz wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird vom ausgefallenen Palladium abfiltriert, das Filtrat in Eis/Wasser gegossen und mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird nach Waschen mit Wasser über Natriumsulfat filtriert und im Rotationsverdampfer eingedampft. Zum Entfernen des restlichen Wassers durch azeotrope Destillation wird noch mehrmals mit Ethylacetat eingedampft. In günstigen

Fällen kristallisiert das Produkt aus wenig Ethylacetat bei Raumtemperatur oder bei - 20°C. Wenn das nicht der Fall ist, wird der Reaktionsansatz auf Kieselgel als Adsorbens chromatographiert.

5.14.1. (3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(cyan)essigsäure-methylester 15/1+2

0.46 g (0.5 mMol) Progesteron-π-allylpalladiumchlorid 9 werden in 2 ml DMSO gelöst und wie oben beschrieben mit dem Natriumsalz von 0.18 ml (2 mMol) Cyanessigäsuremethylester in 2.5 ml DMSO zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung bleibt ein braunes Öl zurück.
Die erste Reinigung erfolgt durch Trockensäulenchromatographie in einer 75 cm langen Säule mit Ether als Elutionsmittel. Vor dem Auftragen wird das Öl mit 3 ml Chloroform verdünnt. Nach der Chromatographie wird die Säule in willkürliche 5 cm Fraktionen zerschnitten. Die Fraktionen 9, 10 und 11 (vom Start beginnend) enthalten das Produkt. Die Substanz wird mit Ethylacetat eluiert. Da aus n-Hexan/Ethylacetat keine Kristallisation erfolgt, wird das Rohprodukt durch präparative Schichtchromatographie weiter gereinigt. Die Substanz wird, gelöst in Chloroform, auf zwei Dickschichtplatten aufgetragen. Die Platten werden je zweimal im System Ether entwickelt. Auf diese Weise wird eine Nebenbande abgetrennt. Da das Produkt nach der Elution mit Aceton auch dieses Mal nicht kristallisiert, wird es nach Eindampfen des n-Hexan/Ethergemisches als amorphe Festsubstanz isoliert.
Ausbeute: 230 mg (55.9 %)

Rf_A: 0.44

$C_{25}H_{33}O_4N$ (411.55)	Ber:	C 72.96	H 8.08	N 3.40
	Gef:	C 72.85	H 8.46	N 3.31

5.14.2. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(cyan)essigsäure-methylester 16/1+2

0.43 g (0.5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid werden mit dem Natriumsalz von 0.18 ml (2 mMol) Cyanessigsäure-methylester zur Reaktion gebracht. Bei der Trockensäulenchromatographie mit Diethylether wird das Produkt in den Fraktionen 12, 13 und 14 gefunden. Dieses Rohprodukt wird auf zwei Dickschichtplatten je drei Mal ebenfalls mit Ether chromatographiert. Nach der Elution der Banden mit Aceton wird das Produkt aus n-Hexan/Ether als amorphe Festsubstanz isoliert.
Ausbeute: 80 mg (20.8 %)

Rf_A: 0.20

$C_{23}H_{31}O_4N$ (385.51) Ber: C 71.66 H 8.11 N 3.63
Gef: C 71.36 H 8.34 N 3.53

5.14.3. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(phenylsulfonyl)essigsäure-methylester 17A und das Stereoisomere 17B

4.3 g (5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid 8 werden mit dem Natriumsalz von 2.14 g (10 mMol) Phenylsulfonylessigsäuremethylester zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung wird die Ethylacetatlösung solange eingeengt, bis die ersten Kristalle ausfallen. Mann läßt bei -20°C zu Ende kristallisieren.
Das kristalline Produkt wird abgesaugt und mit wenig Ethylacetat gewaschen. Aus der Mutterlauge kann durch Einengen noch mehr Produkt erhalten werden.
Ausbeute: 3.2 g Isomeres A. Das analysenreine Produkt wird durch zweimaliges Umkristallisieren des Rohprodukts aus Ethylacetat erhalten. Die Mutterlauge wird zusammen mit den Waschflüssigkeiten eingedampft und bis zur chromatographischen Trennung bei -20°C aufbewahrt.

Die präparative Trennung der beiden Isomeren A und B des 6β-Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivates von Testosteron erfolgt durch Mitteldruckflüssigkeitschromatographie auf zwei hintereinandergeschalteten Kieselgelfertigsäulen (s.o.). Die eingedampfte Mutterlauge wird mit dem gleichen Volumen Chloroform verdünnt und in 2 ml Portionen auf die untere Säule aufgetragen. Zur Auftrennung der ganzen Mutterlauge sind zwei Säulenläufe erforderlich. Als Elutionsmittel dient Hexan:Ethylacetat = 2:3. Es werden Fraktionen mit ca. 5 ml Volumen (330 Tropfen) gesammelt.

Das reine Isomere A wird von Fraktion 220 (248) bis Fraktion 250 (272) eluiert. Nach dem Eindampfen erhält man durch Kristallisation aus Ethylacetat 290 mg Isomeres A.

Das reine Isomere B wird von Fraktion 270 (298) bis Fraktion 322 (360) eluiert. Die vereinigten Fraktionen werden eingedampft, das farblose Öl in Ethylacetat gelöst und das Produkt mit n-Hexan ausgefällt. Das Isomere B wird durch Eindampfen der Suspension am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur als amorphe Festsubstanz isoliert. Nach Trocknen im Vakuum erhält man 0.75 g.

Für die beiden Isomeren ergeben sich folgende Daten:

17A (Hauptprodukt)

Ausbeute: 3.4 g (68 %)

Fp.: 156-157°C

Rf_C: 0.16

$[\alpha]_D^{20}$: +52.4° (c = 1, Dioxan)

$[\alpha]_D^{20}$: +46.0° (c = 1, $CHCl_3$)

$C_{28}H_{36}O_6S$ (500.66)	Ber:	C 67.17	H 7.25	S 6.40
	Gef:	C 67.19	H 7.61	S 6.90

17B (Nebenprodukt)

Ausbeute: 0.75 g (15 %)

Fp.: (amorph!)

Rf_C: 0.12

$[\alpha]_D^{20}$: +54.4° (c = 1, Dioxan)

$[\alpha]_D^{20}$: +54.6° (c = 1, $CHCl_3$)

$C_{28}H_{36}O_6S$ (500.66) Ber: C 67.17 H 7.25 S 6.40
Gef: C 66.64 H 7.45 S 6.56

5.14.4. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester 18/2 und das Nebenprodukt (3,17-Dioxoandrost-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester 18/1

4.3 g (5 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchlorid 8 werden mit dem Natriumsalz von 1.52 g (10 mMol) Methylsulfonylessigsäuremethylester zur Reaktion gebracht.

Bei -20°C kristallisiert das Produkt mikrokristallin aus Ethylacetat aus. Die Substanz ist mit Mutterlauge verunreinigt. Da sich die Kristalle bei Raumtemperatur leicht in Ethylacetat lösen, läßt sich die Verunreinigung nicht durch Auswaschen entfernen. Der ganze Ansatz wird daher auf zwei hintereinandergeschalteten Kieselgelfertigsäulen im System Hexan:Ethylacetat = 2:3 chromatographiert. Um ein Auskristallisieren in der Probeschleife zu verhindern, wird der ganze Ansatz in 12 ml Chloroform gelöst und in 4 Trennungsgängen chromatographiert. Im 4. Lauf werden beispielsweise die Nebenprodukte und das Hauptprodukt bei einem Fraktionsvolumen von 5 ml wie folgt eluiert:

Fraktionen 104-112	Testosteron
Fraktionen 118-130	Dehydrotestosteron
Fraktionen 230-240	18/1
Fraktionen 248-290	18/2

Für die einzelnen Produkte ergeben sich folgende Daten:

Dehydrotestosteron 27
Ausbeute: 69 mg (1.57 %)

Die physikalischen Daten werden z.T. an Dehydrotestosteron aus anderen Ansätzen ermittelt. Dieses Nebenprodukt kristallisiert aus n-Hexan/Ethylacetat oder Ethylacetat.

Fp.: 200-201°C
Rf_C: 0.24
$[\alpha]_D^{20}$: +137° (c = 1, Dioxan)

$C_{19}H_{26}O_2$ (286.42)

18/1:
Dieses Nebenprodukt ist das 17-Keto-Derivat des Hauptproduktes 18/2. Es entsteht in nichtreproduzierbarer Weise wahrscheinlich durch DMSO-Oxidation. Im beschriebenen Ansatz ist es in so geringer Menge vorhanden, daß es nicht kristallin erhalten werden konnte. Die physikalischen Daten werden daher aus kristallinem Material von anderen Ansätzen ermittelt, wo es aus Ethylacetat kristallisierte. Der Nachweis der 17-Keto-Gruppe erfolgt durch Circulardichroismus und ^{13}C-NMR-Spektroskopie (s.o.).

Fp.: 165-167°C
Rf_C: 0.14

$C_{23}H_{33}O_6S$ (437.60)

18/2 (Hauptprodukt):
18/2 kristallisiert aus Ethylacetat nach Eindampfen der Fraktionen, wobei ein großer Teil des Produkts in der gelben Mutterlauge verbleibt.
Ausbeute: 1.71 g (39 %)
Fp.: 178-179°C
Rf_C: 0.10
$[\alpha]_D^{20}$: +89.5° (c = 1, Dioxan)
$C_{23}H_{34}O_6S$ (438.60) Ber: C 62.99 H 7.84 S 7.31
Gef: C 61.67 H 7.39 S 7.43

5.14.5. (3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)(methylsulfonyl)essigsäure-methylester 19/2 und das analoge 17α-Derivat 19/1

4.55 g (5 mMol) Progesteron-π-allylpalladiumchlorid 9 werden mit dem Natriumsalz von 1.52 g (10 mMol) Methylsulfonylessigsäuremethylester zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung kristallisiert ein Teil des Produkts bei -20°C aus dem Ansatz aus. Da der ganze Ansatz durch präparative Mitteldruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt wird, werden die Kristalle in Chloroform gelöst und der Ansatz wieder eingedampft. Das zurückbleibende Öl wird mit demselben Volumen Chloroform verdünnt. Für einen Säulenlauf auf zwei hintereinandergeschalteten Kieselgelfertigsäulen werden zweimal 2 ml dieser Lösung auf die untere Säule gepumpt. Zur Trennung des ganzes Ansatzes sind zwei Säulenläufe erforderlich. Um ein Auskristallisieren des Produkts durch das Elutionsmittel n-Hexan/Ethylacetat in der Probeschleife zu verhindern, werden vor und nach dem Auftragen einige ml Chloroform durch das System gepumpt. Bei beiden Säulenläufen werden Nebenprodukte und das Hauptprodukt bei 5 ml-Fraktionierung (300 Tropfen) wie folgt eluiert:

Fraktionen 70(72) - 80(96)	Progesteron
Fraktionen 94(98) - 98(100)	Dehydroprogesteron
Fraktionen 141(148)-149(155)	19/1
Fraktionen 156(159)-215(230)	19/2

Progesteron und Dihydroprogesteron sind jeweils nur in ganz geringen Mengen vorhanden. Die Fraktionen 150(156) bis 155(158) sind Überlappungsfraktionen, die 19/1 und 19/2 enthalten. Auch die Fraktionen 156(159) bis 168(168) sind noch mit wenig 19/1 verunreinigt.

19/1 kristallisiert bei -20°C aus Ethylacetat.

19/2: Nach Eindampfen der Fraktionen bleibt ein gelbes Öl als Rückstand. Nach Verdünnen mit Ethylacetat kristalli-

siert das farblose Hauptprodukt bei -20°C aus: 0.55 g (0.5 g). Aus den Mutterlaugen werden weitere 0.2 g (0.45 g) Produkt gewonnen.

Insgesamt ergeben sich folgende Daten:

19/1 (Nebenprodukt: 17α-Derivat)

Ausbeute: 271 mg (5.8 %)
Fp.: 187-189°C (Zers.)
Rf_C: 0.21
$[\alpha]_D^{20}$: +17.1° (c = 1, Dioxan)

$C_{25}H_{36}O_6S$ (464.62) Ber: C 64.64 H 7.81 S 6.90
Gef: C 64.69 H 7.72 S 6.91

19/2 (Hauptprodukt: 17β-Derivat)

Ausbeute: 1.7 g (36.6 %)

Fp.: 168-169°C
Rf_C: 0.15
$[\alpha]_D^{20}$: +122.7° (c = 1, Dioxan)

$C_{25}H_{36}O_6S$ (464.62) Ber: C 64.63 H 7.81 S 6.90
Gef: C 64.37 H 7.71 S 6.88

5.14.6. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6β-yl)malonsäure-dimethylester 20

0.86 g (1 mMol) Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplex 8 werden mit dem Natriumsalz von 0.26 g = 0.23 ml (2 mMol) Malonsäuredimethylester zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung kristallisiert ein Teil des Produkts im Ansatz aus. Die Kristalle werden mit Chloroform gelöst und der ganze Ansatz der chromatographischen Trennung auf zwei Kieselgelfertigsäulen unterworfen. Das Produkt wird in den Fraktionen 165-210 eluiert. Es wird aus Ethylacetat kristallisiert.
Ausbeute: 0.45 g (54 %)

Fp.: 204-205°C (Ethylacetat) Lit.[15]: 221-223°C (wässr. Ethanol)

Rf_C: 0.27

$[\alpha]_D^{20}$: +88.3° (c = 1, Dioxan)

$[\alpha]_D^{20}$: +89.0° (c = 1, $CHCl_3$)

$[\alpha]_D^{20}$: +45.0° (c = 0.5, $CHCl_3$) Lit.[15]: $[\alpha]_D^{20}$: +86.7° (c = 0.49, $CHCl_3$)

$C_{24}H_{34}O_6$ (418.54) Ber: C 68.87 H 8.19
Gef: C 68.86 H 8.31

5.14.7. (3,20-Dioxopregn-4-en-6β-yl)malonsäure-dimethylester 21

0.91 g (1 mMol) Progesteron-π-allylpalladiumchloridkomplex 9 werden mit dem Natriumsalz von 0.26 g = 0.23 ml (2 mMol) Malonsäuredimethylester zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung erhält man ein gelbbraunes Öl. Es wird mit Chloroform verdünnt und in der oben beschriebenen Weise chromatographiert. Das Produkt wird in den Fraktionen 86-104 eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittelgemisches im Vakuum wird der ölige Rückstand mehrmals mit Ethylacetat eingedampft bis das Produkt kristallisiert.
Ausbeute: 622 mg (70 %)
Das Produkt wird aus n-Hexan/Ethylacetat bei -20°C umkristallisiert.

Fp.: 134-136°C; Lit.[15]: 136-138°C

Rf_C: 0.37

$[\alpha]_D^{20}$: +137.2° (c = 1, Dioxan); Lit.[15]: $[\alpha]_D$: +141.2° (c = 0.44, $CHCl_3$)

$C_{26}H_{36}O_6$ (444.58) Ber: C 70.24 H 8.16
Gef: C 70.44 H 8.50

5.15. Spaltung des Testosteroncarbonsäureesterderivats 17A durch Halolyse (Lithiumjodid/Pyridin bzw. 2,6-Lutidin)[19)]

5.15.1. Darstellung von wasserfreiem Lithiumjodid

Pulverisiertes Lithiumjodid mit 2 Mol Kristallwasser wird im Vakuum auf 270°C erhitzt. Dabei entsteht eine Schmelze. Nach Entfernung des Wassers im Vakuum wird das wasserfreie Lithiumjodid fest. Nach einstündigem Erhitzen wird das hygroskopische Salz rasch in kleine Portionen abgefüllt.

5.15.2. Halolyse von Testosteron-6β-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A

51 mg (0.1 mMol) Testosteron-6β-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A werden in 2 ml Pyridin bzw. 2 ml 2,6-Lutidin gelöst; dann werden 95 mg (0.7 mMol) Lithiumjodid (wasserfrei) zugegeben und 4 Stunden bzw. 8 Stunden unter Rückfluß gekocht; während dieser Zeit wird Stickstoff über den Reaktionsansatz geleitet. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird zum Ansatz Eis/Wasser gegeben, mit 1 ml konz. HCl angesäuert und zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt. Die Ethylacetatphase wird mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert, wieder angesäuert und mit Ethylacetat rückextrahiert. Die Ethylacetatphase wird getrocknet, eingedampft und dann dünnschichtchromatographisch im System F und ^{1}H-NMR-spektroskopisch untersucht.

Rf_F: 0.39; Rf_F (rel. zu 17A:1.00): 0.73

5.16. Spaltung des Testosteroncarbonsäureesterderivats 17A durch Ethanolyse (KOH/EtOH abs.)

201 mg (0.4 mMol) 6β-Phenylsulfonylessigsäuremethylester von Testosteron 17A werden in 12 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 67.2 mg (1.2 mMol) Kaliumhydroxid in 6 ml Ethanol wird der Ansatz unter Stickstoff 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Dann wird der Ansatz eingedampft und zum Rückstand Eis/Wasser gegeben. Nach dem Ansäuern mit 0.7 ml 1 n HCl wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wird mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat gelöst und auf zwei Kieselgeldickschichtplatten aufgetragen und im Fließmittelsystem Chloroform:Ethanol: Eisessig = 92:8:1 chromatographiert. Die Lösungsmittelfront erreicht das obere Plattenende nach 6 Stunden. Das Hauptprodukt ist dann etwa 6 cm, das Nebenprodukt 8 cm, die Ausgangssubstanz 11 cm gewandert. Das Hauptprodukt wird mit Ethylacetat eluiert und aus wenig Ethylacetat kristallisiert. Das Produkt enthält noch anorganische Bestandteile aus dem Adsorbens. Die Kristalle werden daher in Ethylacetat gelöst, und die Lösung filtriert. Das Produkt läßt sich dann aber nicht mehr aus Ethylacetat oder Hexan/Ethylacetat kristallisieren. Nach dem Eindampfen von Hexan/Ethylacetat erhält man das Produkt als amorphes Material.

Ausbeute: 37 mg (10.7 %)

Rf_F: 0.26; Rf_F (rel. zu 17A: 1.00): 0.73

$C_{21}H_{28}O_4$ (344.46)

Das Nebenprodukt hat einen Rf_F (rel. zu 17A:1.00): 0.56

5.17. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Spaltung der Testosteron- und Progesteroncarbonsäurederivate 17A und 19/1 durch alkalische Hydrolyse (NaOH/H_2O/Ethanol)

1 mMol Testosteron- bzw. Progesteroncarbonsäureesterderivat wird unter Rühren in 90 ml Ethanol fast ganz gelöst. Nach Zugabe von 400 mg (10 mMol) NaOH, gelöst in 10 ml Wasser, wird der Reaktionsansatz unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. - Der Verlauf der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch im Fließmittelsystem F untersucht. Dazu wird 1 Tropfen des Reaktionsansatzes mit 3 Tropfen 1 n HCl angesäuert. Nach Zugabe von 4 Tropfen Ethylacetat wird geschüttelt und ein Teil der Ethylacetatphase auf die Dünnschichtplatte aufgetüpfelt. Für die Untersuchung des Zwischenprodukts (ungesättigter Ester 22 bzw. 24) wird nach 3-4 Stunden, zur Isolierung des Endprodukts (ungesättigte Carbonsäure 23 bzw. 25) wird nach 9 bzw. 15 Stunden aufgearbeitet. Dazu wird der Ansatz mit 11 ml 1 n HCl angesäuert und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird nach Zugabe von Wasser dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird noch mehrmals mit Ethylacetat eingedampft, bis das Produkt kristallisiert. Das Produkt wird mit wenig Ethylacetat suspendiert, abgesaugt, mit wenig Ethylacetat gewaschen und im Vakuum getrocknet.

5.17.1. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)carbonsäure 23

2.06 mg (2 mMol) Testosteron-6β-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A werden in 180 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 20 ml Natronlauge mit 800 mg (20 mMol) NaOH wird 15 Stunden gerührt. Das Produkt kristallisiert schon während der Ethylacetatextraktion.

Ausbeute: 535 mg (77.7 %)

Fp.: 247-249°C

Rf_F: 0.43; Rf_F (rel. zu 17A:1.00): 0.73

$[\alpha]_D^{20}$: +225° (c = 1, Dioxan)

$C_{21}H_{28}O_4$ (344.46) Ber: C 73.23 H 8.19
Gef: C 73.58 H 8.14

5.17.2. (3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbonsäure 25

465 mg (1 mMol) Progesteron-6β-methylsulfonylessigsäure-methylester 19/2 werden 9 Stunden mit der wässrig-ethanolischen Natronlauge (10 mMol NaOH; 10 ml Wasser; 90 ml Ethanol) gerührt. Nach der Aufarbeitung kristallisiert das Produkt aus Ethylacetat aus.

Ausbeute: 189 mg (51 %)

Fp.: 220-222°C

Rf_F: 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: +273° (c = 1, Dioxan)

$C_{23}H_{30}O_4$ (370.50) Ber: C 74.57 H 8.16
Gef: C 74.50 H 8.22

5.17.3. (3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbonsäure-ethylester 24 als Zwischenprodukt aus der alkalischen Partialhydrolyse von 19/2

232 mg (0.5 mMol) Progesteron-6β-methylsulfonylessigsäure-methylester 19/2 werden in 45 ml abs. Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 5 ml Natronlauge mit 200 mg NaOH (5 mMol) wird die Lösung 2 1/2 Stunden unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 5.5 ml 1 n HCl wird eingedampft. Der Rückstand wird zwischen Ethylacetat und H_2O verteilt. Dann wird die Ethylacetatphase mit H_2O gewaschen und einge-

dampft. Nach monatelangem Stehen bei -20°C kristallisieren aus dem öligen Rückstand 55.5 mg (30 %) Endprodukt 25 aus.

Zur Abtrennung des Zwischenprodukts 24 von den Komponenten 19/2 und 25 wird die Mutterlauge, gelöst in Chloroform, auf eine Kieselgelfertigsäule Si60 Größe A gepumpt. Die Elution erfolgt mit Chloroform:Ethanol = 95:5. Bei einem Fraktionsvolumen von 1.5 ml werden das Zwischenprodukt 24 in den Fraktionen 7, 8, 9 und die beiden anderen Komponenten in den Fraktionen 11 und 12 eluiert. Die vereinigten Fraktionen 7, 8 und 9 werden eingedampft, der Rückstand wird zuerst mit Ethylacetat, dann mit n-Hexan eingedampft. Der Rückstand ist ein schaumiges Material, das nach Trocknen im Vakuum bei ca. 57°C "schmilzt".

Rf_C: 0.47
$[\alpha]_D^{20}$: +180° (c = 1, Dioxan)

$C_{25}H_{34}O_4$ (398.55) Ber: C 75.34 H 8.60
Gef: C 72.26 H 8.45

5.18. Veresterung der Testosteron- und Progesteroncarbonsäurederivate 23 und 25 mit Diazomethan[170] für die HPLC-Untersuchung

5.18.1. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)carbonsäure-methylester 22 und (3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbonsäure-methylester 26

Zur Darstellung des Methylesters werden 69 mg (0.2 mMol) Testosteron-6-carboxymethyliden bzw. 74 mg (0.2 mMol) Progesteron-6-carboxymethyliden in jeweils 5 ml Ethanol/Wasser = 9:1 gelöst. Dazu gibt man portionsweise eine Diazomethanlösung[174] in Ether bis zur bleibenden Gelbfärbung. Diese Lösung wird aus ca. 1 g Nitrosomethylharnstoff in 40 %iger KOH, die mit insgesamt 12 ml Ether überschichtet ist, hergestellt. Nach 1 1/2 stündigem Stehen sind im DC

im Fließmittelsystem F nur noch Spuren des Carbonsäurederivats nachweisbar. Nach vierstündigem Stehen ist keine Änderung des Verhältnisses Edukt zu Produkt eingetreten. Nach Eindampfen des Ethers wird zwischen Ethylacetat und 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt. Der Ethylacetatextrakt wird mit Wasser gewaschen und eingedampft. - Der Rückstand wird mehrmals mit Ethylacetat gelöst und wieder eingedampft. Das Produkt wird in der HPLC untersucht.

5.18.2. (3,20-Dioxopregn-4-en-6-methyliden)carbonsäuremethylester 26

185 mg (0.5 mMol) Progesteron-6-carboxymethyliden 25 werden in 11.25 ml Ethanol gelöst, dann werden 1.25 ml H_2O zugegeben. Im Verlauf von 2 Stunden wird portionsweise so viel etherische Diazomethanlösung bei Raumtemperatur zugegeben, bis im DC im Fließmittelsystem F kein Carbonsäurederivat mehr nachgewiesen werden kann. Nach Eindampfen der Lösungsmittel kristallisiert das Produkt. Zur Abtrennung einer gelben Verunreinigung wird auf einer Kieselgelfertigsäule Si60 Größe A chromatographiert. Bei einem Fraktionsvolumen von 0.8 ml wird der Ester in Fraktion 7 bis 10 eluiert. Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel wird das kristalline Material zunächst mit Ethylacetat dann mit n-Hexan zum Entfernen des restlichen Ethanols eingedampft, dann im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 109 mg (56.7 %) (Verluste durch undichtes Aufgabeventil!)

Fp.: 149-152°C

Rf_C: 0.5

$[\alpha]_D^{20}$: +226° (c = 1, Dioxan)

$C_{24}H_{32}O_4$ (384.52) Ber: C 74.97 H 8.39
Gef: C 74.31 H 8.49

5.19. 3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4-ylmercapto)propionsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat nach der Carbodiimidmethode[10,11]

100 mg (0.24 mMol) Progesteron-4-S-mercaptopropionsäure 2 in 10 ml DMF werden zu einer Lösung von 100 mg (0.52 mMol) N-Ethyl,N'(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid in 4 ml Wasser gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wird zu dieser Lösung eine Lösung von 200 mg (0.00286 mMol) Rinderserumalbumin in 20 ml 0.02 m Phosphatpuffer pH 7.1 gegeben. Der Ansatz wird 2 Tage gerührt und dann bei 4°C zuerst 12 Stunden gegen 2 Liter 0.05 m Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8), anschließend 2 Tage gegen entsalztes Wasser dialysiert; danach wird gefriergetrocknet.
Ausbeute: 226 mg

Das Konjugat enthält im Mittel etwa 7 Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin.

5.20. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)carbonsäure(23)-Rinderserumalbumin-Konjugat nach der Carbonyldiimidazolmethode[17]

35 mg (0.1 mMol) Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23 werden in 5 ml DMF gelöst; nach Zugabe von 32.4 mg (0.2 mMol) N,N'-Carbonyldiimidazol wird 30 Minuten unter Stickstoff gerührt. 140 mg (0.002 mMol) Rinderserumalbumin werden in 12 ml Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit 1-2 Tropfen Triethylamin auf pH 10.5 eingestellt. Die Imidazolidlösung wird dann zur gut gerührten Rinderserumalbuminlösung gegeben. Nach Zugabe von 4 ml Wasser wird wieder auf pH 10.5 eingestellt. Nach 16-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Ansatz bei 4°C gegen voll entsalztes Wasser dialysiert und dann gefriergetrocknet.

Ausbeute: 129.6 mg (90.4 %)

Das Konjugat enthält im Mittel 4.7 Mol Testosteronderivat pro Mol Rinderserumalbumin.

5.21. Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Progesteron- und Testosteroncarbonsäure-Rinderserumalbuminkonjugate nach der Anhydrid-Methode[158]

0.1 mMol Steroidcarbonsäure werden in 2 ml Dioxan gelöst. Zu der Lösung werden 0.07 ml (0.3 mMol) Tri-n-butylamin und nach Abkühlen im Eisbad 0.04 ml (0.3 mMol) Chlorameisensäureisobutylester zugegeben. Die Lösung wird eine Stunde unter Rühren bei 12-14°C gehalten.

140 mg (0.002 mMol) Rinderserumalbumin werden in 7 ml Wasser gelöst; zu der Lösung werden 7 ml Dioxan gegeben. Die Lösung wird dann auf pH 8.5 eingestellt und im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Die Lösung des gemischten Steroidcarbonsäureanhydrids wird dann zu der Rinderserumalbuminlösung gegeben. Der pH-Wert wird im Laufe der nächsten 1 1/2 Stunden durch Zugabe von 0.1 n NaOH bei pH 8.3 bis 8.5 konstant gehalten. Nach weiteren 2 Stunden Rühren bei 0°C wird der Reaktionsansatz 3 1/2 Tage bei 4°C gegen voll entsalztes Wasser dialysiert und dann gefriergetrocknet.

5.21.1. 3-(3,20-Dioxopregn-4-en-4-ylmercapto)propionsäure(2)-Rinderserumalbumin-Konjugat

Zur Darstellung des Progesteron-Konjugats werden 42 mg (0.1 mMol) Progesteron-4-S-mercaptopropionsäure 2 eingesetzt.
Ausbeute: 125 mg (73 %)

Das Konjugat enthält im Mittel 36.9 Mol Progesteronderivat/Mol Rinderserumalbumin.

5.21.2. (17β-Hydroxy-3-oxoandrost-4-en-6-methyliden)carbonsäure(23)-Rinderserumalbumin-Konjugat

Zur Darstellung des Testosteronkonjugats werden 35 mg (0.1 mMol) Testosteron-6-methylidencarbonsäure eingesetzt. Ausbeute: 154 mg (94.4 %)

Das Konjugat enthält im Mittel 33 Mol Testosteronderivat/ Mol Rinderserumalbumin.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die zur Entwicklung eines spezifischen Steroid-Radioimmunoassays erforderlichen künstlichen Antigene erhält man durch Kupplung von Steroidcarbonsäurederivaten an die Lysinreste von Rinderserumalbumin.

Die Carboxylgruppen werden in dieser Arbeit entweder an C4 oder an C6 in das Steroid eingeführt. Dazu werden die 4-En-3-ketosteroide Progesteron und Testosteron zunächst am allylischen C-Atom C6 funktionalisiert; in einem oder zwei weiteren Reaktionsschritten entstehen die an C4 bzw. C6 substituierten Carbonsäurederivate.

Im ersten Syntheseteil werden die zwei- bzw. vier-stufigen Synthesen der 4-S-Mercaptopropionsäurederivate von Progesteron bzw. Testosteron beschrieben: Progesteron bzw. 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)testosteron 3, das man aus Testosteron mit Dihydropyran erhält, werden mit N-Bromsuccimid an C6 allylisch bromiert. Die 6β-Bromderivate 1 und 4 werden mit dem Dianion der 3-Mercaptopropionsäure unter S_N2-Bedingungen zur Reaktion gebracht. Statt der erwarteten 6α-Carboxyethylthioetherderivate entstehen die an C4 vinylisch substituierten 4-S-Carboxyethylthioenoletherderivate 2 und 6. Den Beweis für die eingetretene Allylumlagerung liefert das ^{13}C-NMR-Spektrum nach der Spin-Echo-Methode: Beide olefinische C-Atome C4 und C5 sind quartär, also substituiert. Im ^{1}H-NMR-Spektrum ist kein vinylisches Proton vorhanden. Das UV-Spektrum zeigt im $\pi \rightarrow \pi^*$-Bereich, daß im Molekül noch ein α, β-ungesättigtes Keton vorhanden ist; im $n \rightarrow \pi^*$-Bereich ist ein neues intensives Maximum vorhanden. Ein zweistufiger Reaktionsmechanismus wird vorgeschlagen: 1. Allylumlagerung nach dem S_N2'- Mechanismus. 2. Rückbildung des konjugierten 4-En-3-on-Systems durch basenkatalysierte Enolketotautomerie (Prototropie).

Wie ^{13}C-NMR-Messungen zeigen, liegen die 17-O-(Tetrahydro-2-pyranyl)derivate 3, 4 und 6 als Diastereomerengemische mit wechselnder Zusammensetzung vor. Während bei 3 ein etwa 1:1 Gemisch der beiden Komponenten vorliegt, ist nach zwei weiteren Reaktions- und Kristallisationsschritten nur noch eine THP-Komponente vorhanden. - Aus 6 erhält man nach Abspaltung der THP-Schutzgruppe das Testosteronderivat 7.

In der Felddesorptionsmassenspektrometrie werden die THP- und Bromreste leicht, die Thioenolethergruppe schwer abgespalten.

Im zweiten Syntheseteil werden die Synthesen der 6-Methylidencarbonsäurederivate von Testosteron und Progesteron auf einem neuen Reaktionsweg beschrieben. Zunächst werden die dimeren π-Allylpalladiumchloridkomplexe von Testosteron 8 und von Progesteron 9 dargestellt. Diese reagieren mit den Natriumsalzen von CH-aciden Verbindungen zu den allylisch-alkylierten 4-En-3-ketosteroiden. Es entstehen ausschließlich die 6β-substituierten Testosteron- und Progesteronderivate. In Analogie zu den schon bekannten Malonsäuredimethylesterderivaten 20 bzw. 21 von Testosteron bzw. Progesteron werden das Phenylsulfonylessigsäuremethylesterderivat von Testosteron 17A und die Methylsulfonylessigsäuremethylesterderivate von Testosteron 18/2 und von Progesteron 19/2 synthetisiert. Die Nebenprodukte 17B, 19/1 und 18/1, die durch Einwirkung des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid unter den Reaktionsbedingungen auf die jeweiligen Hauptprodukte (17A, 18/2 und 19/2) entstehen, werden von diesen durch Mitteldruckflüssigkeitschromatographie auf Kieselgelfertigsäulen abgetrennt.

Die zur allylischen Alkylierung eingesetzten CH-aciden Verbindungen Phenyl- und Methylsulfonylessigsäuremethylester werden aus den entsprechenden Nitrilen in einem Reaktionsschritt mit Methanol/Chlorwasserstoff dargestellt. Phenyl-

sulfonylessigsäuremethylester wird alternativ aus Phenylmercaptoessigsäure durch Oxidation zur Phenylsulfonylessigsäure und anschließende Veresterung dargestellt.

Um die physikalisch-chemische Charakterisierung der π-Allylpalladiumchloridkomplexe 8 und 9 zu erleichtern, werden aus dem Testosteronkomplex 8 durch Ligandenaustausch die dimeren Bromid(10)-, Jodid(11)-, Thiocyanat(12)- und die monomeren Chlorid-Pyridin(13)- und Chlorid-Triphenylphosphin(14)-Komplexe dargestellt.

In den Felddesorptionsmassenspektren dieser Komplexe treten die für die entsprechenden Halogen- und Palladiumisotope charakteristischen Massenpeaks auf. Die CD-Spektren zeigen bathochrome Verschiebungen bei zwei positiven Cottoneffekten im $n \rightarrow \pi^*$-Bereich in der Reihe Thiocyanat, Chlorid-Pyridin, Chlorid, Bromid, Jodid und bei den negativen Cottoneffekten im $\pi \rightarrow \pi^*$-Bereich in der Reihe Chlorid, Bromid, Jodid.

Bei den ^{13}C-NMR-Spektren dieser Komplexe ist eine Zuordnung aller Signale durch Vergleich mit teilweise bekannten Literaturwerten, mit Testosteron und Dihydrotestosteron möglich. Der Ligandeneinfluß auf die ^{13}C-chemischen Verschiebungen ist nur beim Dimethylsulfoxidkomplex 8a deutlich ausgeprägt.

Die von der Arbeitsgruppe Winter im Institut für Organische Chemie durchgeführten Röntgenstrukturanalysen des dimeren Testosteron-π-allylpalladiumchloridkomplexes 8 und von Testosteron-6β-phenylsulfonylessigsäuremethylester 17A werden diskutiert:
Beim dimeren Trihaptokomplex 8 stehen die Palladiumatome axial α-seitig. Die Pd_2-Cl_2-Brücken sind nicht wie erwartet planar, sondern bilden einen Faltungswinkel von 135° zwischen beiden PdCl-Koordinationsebenen. Beide Steroid-

teilmoleküle sind flacher als Testosteron und zeigen signifikante Konformationsunterschiede.
Bei der Rötgenstrukturanalyse von 17A wird S-Konfiguration am neu eingeführten Asymmetriezentrum C-a gefunden. Die Methylestergruppierung liegt im Kristall in der Nähe des A-Rings. Die 6β-Substitution führt im Vergleich zu Testosteron zu einer wesentlich stärker ausgeprägten 1α-Sofakonformation im A-Ring und zu einer verdrillten Sesselkonformation im B-Ring.

Wie die ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR-, CD- und IR-Spektren, sowie Drehwertmessungen zeigen, handelt es sich beim Isomerenpaar 17A und 17B entweder um die S/R-Konfigurationsisomeren an C-a oder wahrscheinlicher um Torsionsdiastereomere, bei denen Rotationsbehinderung des Phenylsulfonylessigsäuremethylestersubstituenten um die C6-C-a-Achse vorliegt.

19/1 bzw. 19/2 sind die isomeren (17α)-Isoprogesteron bzw. (17β)-Progesteron- 6β-methylsulfonylessigsäuremethylesterderivate. Das zeigen die ^{1}H- und ^{13}C-NMR- und vor allem die CD-Spektren, sowie die Drehwerte und Schmelzpunkte: Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren von 19/1 zeigen Hochfeldverschiebungen auf Grund von 1,3-diaxialen Van-der-Waals-Wechselwirkungen des 17α-Substituenten mit entsprechenden α-ständigen H-Atomen. In den CD-Spektren hat der Cottoneffekt für die C20-Carbonylgruppe bei 19/1 (17α) negatives, bei 19/2 (17β) positives Vorzeichen.

Bei 18/1 ist die 17β-OH-Gruppe von 18/2 zur Carbonylgruppe oxidiert. Das wird durch das CD-Spektrum bewiesen.

Bei den ^{13}C-NMR-Spektren der 6β-alkylierten Produkte gelingt die Zuordnung aller Signale durch Vergleich mit dem Ausgangssteroid und den zur Alkylierung eingesetzten CH-aciden Estern. Der Einfluß des Substituenten in Abhängigkeit seiner CH-Acidität auf die chemischen Verschiebungen der A- und B-Ring-Signale wird diskutiert.

Die CD-Spektren der 6β-substituierten Derivate zeigen im $n \rightarrow \pi^*$-Bereich zum Teil vollständige z.T. nur teilweise Vorzeichenumkehr der Cottoneffekte. Dies läßt sich mit den ^{13}C-Tieffeldverschiebungsinkrementen der C19-Methylgruppe in Korrelation bringen. Auch beim $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergang zeigen die CD-Spektren nicht bei allen 6β-substituierten Derivaten den erwarteten Vorzeichenwechsel. Dieses Verhalten kann noch nicht interpretiert werden.

Bei der Felddesorptionsmassenspektrometrie (FD-MS) werden die Phenylsulfonyl- bzw. Methylsulfonyl-Gruppen aus den 6β-Substituenten leicht abgespalten, während die Methylestergruppen stabil sind. Auch in den FD-MS-Spektren der Malonsäuredimethylesterderivate sind nur die Molekülpeaks vorhanden. Dagegen werden unter den Bedingungen der Elektronenstoßmassenspektrometrie (MS) die jeweiligen Substituenten ganz oder teilweise abgespalten.

Bei der Reaktion der Testosteron- bzw. Progesteronderivate 17A bzw. 19/2 mit wässriger Natronlauge in Ethanol bei Raumtemperatur werden zunächst die Phenylsulfonyl- bzw. Methylsulfonylreste durch E2-Eliminierung abgespalten. Erst nach weiterer Alkalibehandlung werden dann die α,β-ungesättigten Ester hydrolysiert. Es entstehen die 6-Methylidencarbonsäurederivate von Testosteron 23 bzw. von Progesteron 25.

In den ^{13}C-NMR-Spektren gelingt die Zuordnung der Signale durch Vergleich mit denen von 3,3-Dimethylacrylsäure. CD-Messungen von 23 und 25 bestätigen die 6-Methylidenstruktur.

Die Zwischenprodukte 22 bzw. 24 sind die α,β-ungesättigten Methyl- bzw. Ethylester. Letzterer ist durch basisch katalysierte Umesterung aus dem Progesteron-6-methylidencarbonsäuremethylester entstanden. Diese Ergebnisse werden durch Dünnschicht- und Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Partialhydrolysate und aus den ^{1}H-NMR- und Massenspektren

des isolierten Zwischenprodukts 24 und des durch die Diazomethanbehandlung von 25 entstandenen α, β-ungesättigten Methylesters 26 erhalten.

Ob die Carboxyl- bzw. Estergruppen an der exocyclischen Doppelbindung cis- oder transständig sind, kann auf Grund der vorliegenden spektroskopischen Daten noch nicht entschieden werden, obwohl aus dem 400 mHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Progesteron-6-methylidencarbonsäuremethylester 26 die Fernkopplungskonstanten für beide vinylische H-Atome ermittelt werden können.

Bei der Halolyse (Rückflußkochen in Pyridin oder Lutidin mit Lithiumjodid) von 18/2 oder 17A wird ebenfalls die Testosteron-6-methylidencarbonsäure aber in sehr geringer Ausbeute gebildet.

Bei der Ethanolyse (Erhitzen mit Kaliumhydroxid in absolutem Ethanol) von 17A entsteht ein noch nicht vollständig identifizierter Ethylester mit stark polaren Eigenschaften. Diese Substanz ist nicht analog mit dem bei der alkalischen Hydrolyse von 19/2 gebildeten Ethylester. Als Nebenprodukt entsteht wieder die Testosteron-6-methylidencarbonsäure.

Im letzten Teil der Arbeit wird die Synthese von künstlichen Antigenen durch Kupplung von Progesteron-4-S-mercaptopropionsäure 2 und von Testosteron-6-methylidencarbonsäure 23 an die ε-Aminogruppen der Lysinreste des Rinderserumalbumins nach der Anhydrid-, der Carbonyldiimidazol- und der Carbodiimid-Methode beschrieben. Die Mole Steroidreste pro Mol Rinderserumalbumin (RSA) werden nach der UV-Methode bestimmt. Während mit der Anhydridmethode bei 2 bzw. 23 im Mittel 37 bzw. 33 Mol Steroidarbonsäurereste an RSA gebunden werden, sind es bei 2 mit der Carbodiimidmethode nur 7 Mol pro Mol RSA und bei 23 mit der Carbonyldiimidazolmethode im Mittel sogar nur weniger als 5 Mol pro Mol RSA.

Das nach Immunisierung von Kaninchen mit dem Progesteron-4-S-mercaptopropionsäure(2)-RSA-Konjugat erhaltene Antiserum zeigt hohe Kreuzreaktion (90.7 %) mit 5α-Pregnan-3,20-dion und eignet sich daher für den Radioimmunoassay dieses Steroids.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. K. Lübke, B. Nieuweboer, Immunologische Teste für niedermolekulare Wirkstoffe, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1978
2. H. Eckert, H. Strecker, Naturwiss. 65, 245 (1978)
3. P. Vesci, K.H. Gless, Adlosteron Radioimmunoassay, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1975
4. F. Kohen, S. Bauminger, H.R. Lindner, Steroid Immunoassay: Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop, Alpha Omega Publishing Ltd. Cardiff, Wales 1975, S. 11
5. A.E. Kellie, K.V. Lichman, P. Samarajeewa, Steroid Immunoassay: Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop, Alpha Omega Publishing Ltd. Cardiff, Wales 1975, S. 33
6. B. Africa, E. Haber, Immunochemistry 8, 479 (1971)
7. H.L. Holland, U. Daum, E. Riemland, Tetrahedron Lett. 22, 5127 (1981)
8. D. Onken, Steroide, Akademie Verlag Berlin, Pergamon Press Oxford, Vieweg und Sohn, Braunschweig, S. 48 (1971)
9. Ch. Meystre, A. Wettstein, Experientia 2, 408 (1946)
10. A. Weinstein, H.R. Lindner, A. Friedlander, S. Bauminger, Steroids 20, 789 (1972)
11. H.R. Lindner, E. Perel, A. Friedlander, A. Zeitlin, Steroids 19, 357 (1972)
12. D. Handschuh, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1977)
13. J.H. van Boom, J.D.M. Herschied, C.B. Reese, Synthesis 1973, 169
14. D.J. Collins, W.R. Jackson, R.N. Timms, Tetrahedron Lett. 17, 495 (1976)
15. D.J. Collins, W.R. Jackson, R.N. Timms, Aust. J. Chem. 30, 2167 (1977)
16. Methodicum Chimicum Bd. 5, G. Thieme Verlag Stuttgart, Academic Press New York, London 1973, S. 565
17. P.N. Rao, P.H. Moore Jr., D.M. Peterson, R.K. Tcholakian, J. Steroid Biochem. 9, 539 (1978)

18. P.N. Rao, P.H. Moore Jr., Steroids 28, 101 (1976)
19. F. Elsinger, J. Schreiber, A. Eschenmoser, Helv. Chim. Acta 43, 113 (1960)
20. H.J. Ringold, E. Batres, G. Rosenkranz, Steroids 22, 99 (1957)
21. E. Taschner, B. Liberek, Roczchemii 30, 323 (1956); Chem. Abstr. 51, 1039d (1957)
22. B.M. Trost, Tetrahedron 33, 2615 (1977)
23. L.F. Fieser, M. Fieser, Steroide, Verlag Chemie Weinheim 1961, S. 307 ff
24. H.H. Inhoffen, Chem. Ber. 69, 2141 (1936)
25. A. Roedig, Houben-Weyl, Bd. V/IV, 232 (1960)
26. H.R. Christen, Grundlagen der Organischen Chemie, Verlag Sauerländer Aarau, Diesterweg, Salle, Frankfurt a.M. (1970) S. 623
27. P. Sykes, Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1972, S. 292
28. M. Numazawa, Y. Osawa, Steroids 34, 347 (1979)
29. F. Sondheimer, St. Kaufman, J. Romo, H. Martinez, G. Rosenkranz, J. Am. Chem. Soc. 75, 4712 (1953)
30. R.E. Schaub, M.J. Weiss, J. Org. Chem. 26, 3915 (1961)
31. Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin 1974, S. 172 ff
32. N.S. Bhacca, D.H. Williams, Application of NMR-Spektroscopy in Organic Chemistry, Illustrations form the Steroid Field, Holden-Day Inc. San Francisco, London, Amsterdam, 1964, S. 149
33. K. Tori, K. Kuriyama, Chemistry and Industry 1963, 1525
34. K. Tori, Y. Terui, M. Moriyama, K. Kuriyama, Tetrahedron Lett. 13, 1657 (1968)
35. T.A. Wittstruck, S.K. Malhotra, H.J. Ringold, J. Am. Chem. Soc. 85, 1699 (1963)
36. H.L. Holland, E.M. Thomas, Can. J. Chem. 57, 3069 (1979)
37. D.N. Kirk, D.K. Patel, V. Petrow, J. Chem. Soc. [London] 1956, 627

38. D.N. Kirk, D.K. Patel, V. Petrow, J. Chem. Soc. [London] 1956, 1184
39. K. Kuriyama, M. Moriyama, T. Iwata, K. Tori, Tetrahedron Lett. 9, 1661 (1968)
40. R.N. Totty, J. Hudec, J. Chem. Soc. [D] 1971, 785
41. A.W. Burgstahler, R.C. Barkhurst, J. Am. Chem. Soc. 92, 7601 (1970)
42. B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese, Tetrahedron 24, 639 (1968)
43. C.W. Greenhalg, H.B. Henbest, E.R.H. Jones, J. Chem. Soc. 1951, 1190
44. C.B. Reese, R. Saffhill, J.E. Sulston, J. Am. Chem. Soc. 89, 3366 (1967)
45. C.B. Reese, R. Saffhill, J.E. Sulston, Tetrahedron 26, 1023 (1970)
46. E.J. Corey, K. Narasaka, M. Shibasaki, J. Am. Chem. Soc. 98, 6417 (1976)
47. E.J. Corey, R.L. Danheiser, S. Chandrasekaran, P. Siret, G.E. Keck, J.-L. Gras, J. Am. Chem. Soc. 100, 8031 (1978)
48. loc. cit. 32) S. 78
49. K. Nakanishi in F. Korte, M. Goto, Steroids, Terpenes and Alkaloids, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978, S. 21
50. E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1976, C 40
51. E. Breitmaier, G. Haas, W. Voelter, Atlas of Carbon-13 NMR Data, Heyden, London, Philadelphia, Rheine (1979)
52. M. Herberhold, G.O. Wiedersatz, C.G. Kreiter, Z. Naturforsch. 31B, 35 (1976)
53. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979, S. 218
54. E. Breitmaier, G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977, S. 309

55. loc. cit. 53) S. 78
56. H. Krauch, W. Kunz, Reaktionen der Organischen Chemie Dr. Alfred Hütting Verlag Heidelberg, 3. Aufl. 1966, S. 22
57. E.S. Gould, Mechanismus und Struktur in der Organischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1962, S. 339
58. H.B. Kagan, Organische Stereochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1977, S. 174
59. loc. cit. 57) S. 343 und 344
60. R. Breslow, Organic Reaction Mechanisms, W.A. Benjamin Inc. New York, Amsterdam 1965, S. 69
61. I. Ernest, Bindung, Struktur und Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie, Springer Verlag Wien, New York 1972, S. 123 ff
62. S.R. Hartshorn, Aliphatic Nucleophilic Substitution, Cambridge at the University Press 1973, S. 13 ff
63. B.M. Trost, P.E. Strege, Tetrahedron Lett. 15, 2603 (1974)
64. R.G. Schultz, Chem. Abstr. 71, 482 (1969): 61553v
65. R. Hüttel, M. McNiff, Chem. Ber. 106, 1789 (1973)
66. K. Dunne, F.J. McQuillin, J. Chem. Soc. [C] 1970, 2196
67. S.D. Robinson, B.L. Shaw, J. Chem. Soc. 1963, 4806
68. J. Tsuji, S. Immanura, Bull. Chem. Soc. Jap. 40, 197 (1967)
69. A.D. Ketley, J. Braatz, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1968, 169
70. J. Tsuji, S. Immanura, J. Kiji, J. Am. Chem. Soc. 86, 4491 (1964)
71. M.S. Kharash, R.C. Seyler, F.R. Mayo, J. Am. Chem. Soc. 60, 882 (1938)
72. D.N. Jones, S.D. Knox, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1975, 165
73. R.W. Howsam, F.J. McQuillin, Tetrahedron Lett. 9, 3667 (1968)

74. B.M. Trost, P.E. Strege, L. Weber, T.J. Fullerton, T.J. Dietsche, J. Am. Chem. Soc. 100, 3407 (1978)
75. J.M. Rowe, D.A. White, J. Chem. Soc. [A] 1967, 1451
76. B.M. Trost, Accounts Chem. Res. 13, 385 (1980)
77. D.J. Collins, B.M.K. Gatehouse, W.R. Jackson, G.A. Kakos, R.N. Timms, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1980, 138
78. D.J. Collins, W.R. Jackson, R.N. Timms, Aust. J. Chem. 33, 2663 (1980)
79. K. Henderson, F.J. McQuillin, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1978, 15
80. I.J. Harvie, F.J. McQuillin, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1978, 747
81. W.E. Oberhansli, L.F. Dahl, J. Organomet. Chem. 3, 43 (1965)
82. D.J. Collins, W.R. Jackson, R.N. Timms, Aust. J. Chem. 33, 2761 (1980)
83. H.-R. Schulten, H.M. Schiebel, Naturwiss. 65, 223 (1978)
84. A.I. Scott, A.D. Wrixon, Tetrahedron 27, 2339 (1971)
85. V.N. Sikolov, G.M. Khvostik, I. Ya. Poddubnyi, G.P. Kondratenkov, G.K. Grebenshikov, J. Organomet. Chem. 54, 375 (1973)
86. B.E. Mann, R. Pietropaolo, B.L. Shaw, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1971, 790
87. B.E. Mann, R. Pietropaolo, B.L. Shaw, J. Chem. Soc. [D] 1973, 2390
88. J.W. Blunt, J.B. Stothers, Org. Magn. Res. 9, 439 (1977)
89. I.T. Harrison, E. Kimura, E. Bohme, J.H. Fried, Tetrahedron Lett. 10, 1589 (1969)
90. loc. cit. 53) S. 100
91. Y. Senda, H. Suda, J. Ishiyama, S. Imaizumi, Tetrahedron Lett. 17, 1983 (1976)
92. P. Hütter, Diplomarbeit Universität Tübingen (1980)
93. P. Hütter, Th. Butters, W. Winter, D. Handschuh, W. Voelter, Liebigs. Ann. Chem. 1982, 1111

94. O. Kennard, D.G. Watson, F.H. Allen, S.M. Weeds, Molecular Structures and Dimensions, Bibliography of Organic and Organometallic Crystal Structures, Bohn, Scheltema, Holkema, Utrecht
95. G.R. Davies, R.H.B. Mais, S.O'Brien, P.G. Owston, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1967, 1151
96. P.J. Roberts, R.C. Pettersen, G.M. Sheldrick, N.W. Isaacs, O. Kennard, J. Chem. Soc. Perk. II, 1973, 1978
97. W.L. Duax, C.M. Weeks, D.C. Rohrer, Top. Stereochem. 9, 271 (1976)
98. J.-P. Schmit, G.G. Rousseau, J. Steroid Biochem. 9, 909 (1978)
99. C. Altona, H.J. Geise, C. Romers, Tetrahedron 24, 271 (1976)
100. K. Mislow, Einführung in die Stereochemie, Verlag Chemie, Weinheim 1967, S. 35
101. B.M. Trost, L. Weber, P.E. Strege, T.J. Fullerton, T.J. Dietsche, J. Am. Chem. Soc. 100, 3416 (1978)
102. B.M. Trost, L. Weber, P.E. Strege, T.J. Fullterton, T.J. Dietsche, J. Chem. Soc. 100, 3426 (1978)
103. B.M. Trost, T.R. Verhoeven, J. Am. Chem. Soc. 100, 3435 (1978)
104. W.R. Jackson, J.U. Strauss, Tetrahedron Lett. 16, 2591 (1975)
105. J. Tsuji, Organic Synthesis with Palladium Compounds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1980, S. 37 ff
106. R. Noyori in H. Alper, Transition Metal Organometalics in Organic Synthesis, Vol. I 1976, S. 147-152
107. W.R. Jackson, J.U. Strauss, Austr. J. Chem. 30, 553 (1977)
108. loc. cit. 58) S. 132
109. loc. cit. 53) S. 129
110. A.F. Beecham, D.J. Collins, Austr. J. Chem. 33, 2189 (1980)

111. D.H. Williams, I. Fleming, Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1975, S. 40 ff
112. W.L. Duax, M. Numazawa, Y. Osawa, P.D. Strong, C.M. Weeks, J. Org. Chem. 46, 2650 (1981)
113. E. Breitmaier, W. Voelter, ^{13}C-NMR Spectroscopy, Methods and Applications in Organic Chemistry 2nd Edition, Verlag Chemie Weinheim, New York 1978, S. 225 ff
114. S.K. Malhotra, H.J. Ringold, J. Am. Chem. Soc. 87, 3228 (1965)
115. H.L. Holland, P.R.P. Diakow, Can. J. Chem. 56, 694 (1978)
116. P.H. Solomon, K. Nakanishi, W.E. Fallon, Y. Shimizu, Chem. Pharm. Bull. 22, 1671 (1974)
117. loc. cit. 54) S. 50 u. S. 377
118. T.A. Wittstruck, U.I.H. Williams, J. Org. Chem. 38, 1542 (1973)
119. loc. cit. 23) S. 617
120. A. Butenandt, G. Fleischer, Chem. Ber. 70, 96 (1937)
121. A. Butenandt, L. Mamoli, Chem. Ber. 68, 1847 (1935)
122. A. Butenandt, J. Schmidt-Thome, H. Paul, Chem. Ber. 72, 1112 (1939)
123. loc. cit. 23) S. 512
124. G. Snatzke, Angew. Chem. 80, 15 (1968)
125. G. Snatzke, Methodicum Chimicum Analytik 1/1 Georg Thieme Verlag Stuttgart, Academic Press New York, London 1973
126. M. Legrand, M.J. Rougier in Kagan, Stereochemistry, Fundamentals and Methods, Vol. 2, Determination of Configurations by Dipole Moments, CD or ORD, Georg Thieme Publishers Stuttgart 1977, S. 103
127. C. Djerassi, R. Records, E. Bunnenberg, K. Mislow, A. Moscowitz, J. Am. Chem. Soc. 84, 870 (1962)
128. G. Snatzke, Tetrahedron 21, 413 (1965)
129. G. Snatzke, Tetrahedron 21, 421 (1965)

130. G. Snatzke, Tetrahedron 21, 439 (1965)
131. W.B. Whalley, Chem. Ind. (London) 1962, 2024
132. J. Spiteller-Friedmann, G. Spiteller, Topics in Current Chemistry (Fortschr. Chem. Forschg.) 12/3, 440 (1969)
133. C. Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, St. Kaufmann, J. Pataki, J. Am. Chem. Soc. 72, 4531 (1950)
134. R.K. Haynes, W.R. Jackson, A. Stragalinou, Aust. J. Chem. 33, 1537 (1980)
135. A.C. Cope, S.W. Fenton, J. Am. Chem. Soc. 73, 1668 (1951)
136. I.A. Pearl, D.L. Beyer, J. Am. Chem. Soc. 73, 4091 (1951)
137. D.J. Pasto, R. Kent, J. Org. Chem. 30, 2684 (1965)
138. D.J. Pasto, D. McMillan, T. Murphy, J. Org. Chem. 30, 2688 (1965)
139. loc. cit. 31) S. 443
140. P. Hütter, W. Winter, D. Handschuh, W. Voelter, Liebigs Ann. Chem. 1981, 2045
141. W. Klyne, V. Prelog, Experientia 16, 521 (1960)
142. L. Pauling, Die Natur der chemischen Bindung, Verlag Chemie Weinheim 1961, S. 242 ff
143. R.S. Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog, Angew. Chem. 78, 413 (1966)
144. W.L. Duax, D.A. Norton, Atlas of Steroid Structure New York 1975, Bd. 1, S. 257 Ref. 3 IFI/Plenum
145. P.H. Campsteyn, L. Dupont, O. Dideberg, Acta Cryst. Sect. B 28, 3032 (1972)
146. E.M. Goalakrishna, A. Cooper, D.A. Norton, Acta Cryst. Sect. B 25, 639 (1969)
147. W.L. Duax, P.D. Strong, Steroids 34, 501 (1979)
148. T. Kamiya, M. Hashimoto, O. Nakaguchi, T. Oku, Tetrahedron 35, 323 (1979)
149. W.L. Meyer, A.S. Levinson, J. Org. Chem. 28, 2184 (1963)
150. P.N. Rao, A. Khan, P.H. Moore Jr., Steroids 29, 171 (1977)

151. R. Mazac, K. Syhora, Coll. Czech. Chem. Comm. 35, 1547 (1970)
152. UV-Atlas von organischen Verbindungen, Verlag Chemie 1967, Band 3, Komponente B4/4
153. K. Annen, H. Hofmeister, H. Laurent, R. Wiechert, Synthesis 1982, 34
154. H.D. Jakubke, H. Jeschkeit, Aminosäuren, Peptide, Proteine Akademie-Verlag Berlin 1982, S. 157 ff
155. loc. cit. 1) S. 12 und 13
156. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Liebermann, J. Biol. Chem. 228, 713 (1957)
157. B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser, S. Liebermann, J. Biol. Chem. 234, 1090 (1959)
158. P.N. Rao, A.H. Khan, P.H. Moore Jr., J.W. Goldzieher, Steroids 24, 793 (1974)
159. U. Axen, Prostaglandins 5, 45 (1974)
160. S. Moore, W.H. Stein, J. Biol. Chem. 211, 907 (1954)
161. L. Millewich, C. Gomez-Sanchez, P.C. MacDonald, P.K. Siiteri, J. Steroid Biochem. 6, 1381 (1975)
162. M. Zwirner, M.M. Fawzy, F.C. Bopp, E. Klemm-Wolfgram, D. Handschuh, W. Voelter, A.E. Schindler, Arch. Gynecol. 233, 229 (1983)
163. T. Utne, R.B. Jackson, F.W. Landgraf, J. Org. Chem. 33, 1654 (1968)
164. K.M. Pirke, Steroids 30, 53 (1977)
165. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa. Merck, Darmstadt (1970) Reagenz Nr. 21 und Nr. 159
166. B. Loev, M.M. Goodman, Prog. Separ. Purif. 3, 73 (1970)
167. H. Engelhardt, Hochdruckflüssigkeitschromatographie, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977
168. High Performance Liquid Chromatography, Firmenschrift der Fa. Merck, Darmstadt

169. W. Voelter, W. Stock, N. Afza, M. Przybylski, K.P. Voges, G. Jung in W. Voelter, G. Jung O-(β-Hydroxyethyl)rutoside, neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983, S. 1

170. T.G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, übersetzt und bearbeitet von R. Neumeier und H.R. Maurer, Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York 1981

171. A.C. Ott, M.F. Murray, R.L. Pederson, J. Am. Chem. Soc. 74, 1239 (1952)

172. G. Beck, D. Günther, Chem. Ber. 106, 2758 (1973)

173. I. Pratanata, L.R. Williams, Aust. J. Chem. 27, 2361 (1974)

174. loc. cit. 31) S. 584, 589, 600

175. G.W. Buchanan, C. Reyes-Zamora, D.E. Clarke, Can. J. Chem. 52, 3895 (1974)

176. E. Kleinpeter, R. Borsdorf, ^{13}C-NMR-Spektroskopie in der organischen Chemie, WTB Band 258, Akademie Verlag, Berlin 1981

177. Loc. cit 50) C 90

LEBENSLAUF

Am 30. Mai 1935 wurde ich in Ulm als Sohn des Diplomingenieurs Julius Handschuh und seiner Frau Helene, geb. Frank geboren.
In Esslingen besuchte ich die Grundschule und das Georgii-Gymnasium, das ich nach Abschluß der 6. Gymnasialklasse 1953 verließ. Von 1953 bis 1955 besuchte ich in Stuttgart das Chemische Institut Dr. Flad, staatlich anerkannte Berufsfachschule für Chemotechniker. Die Ausbildung schloß im Frühjahr 1955 mit der Chemotechniker-Prüfung ab.

Von Mai 1955 bis Dezember 1970 arbeitete ich als Chemotechniker in der Biochemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Virusforschung in Tübingen, deren Direktor Prof. Dr. Gerhard Schramm war. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Anderer konnte ich während dieser Zeit auf dem Gebiet der Protein- und Immunchemie mitarbeiten.

Von 1967 bis 1970 besuchte ich das Abendgymnasium in Reutlingen, wo ich im Juli 1970 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1970/71 nahm ich das Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf. Im November 1972 bestand ich die Vordiplomprüfung, im Dezember 1975 den mündlichen Teil der Diplomprüfung.

Von Januar 1976 bis November 1976 schloß sich der experimentelle Teil der Diplomarbeit "Darstellung eines künstlichen Antigens für den Radioimmunoassay von Testosteron" unter Leitung von Prof. Dr. W. Voelter im Institut für Organische Chemie an. Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation "Synthese von 4- und 6-substituierten 4-En-3-ketosteroiden für den Radioimmunoassay von Testosteron und Progesteron" wurde von Juli 1977 bis Juli 1982 unter Leitung von Prof. Dr. W. Voelter am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Seit Dezember 1981 bin ich wissenschaftlicher Angestellter am Physiologisch-chemischen Institut und war zunächst im Physiologisch-chemischen Praktikum für Mediziner tätig; seit dem Wintersemester 1982/83 bin ich im Organisch-chemischen Praktikum für Biochemiker beschäftigt.

Seit Juli 1961 bin ich mit Maria Handschuh, geb. Dürr verheiratet; wir haben einen Sohn.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, M. Brendle, G. Dähn,
G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier,
R. Hamm, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack,
H. Krüger, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Machleidt,
H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Opitz,
H. Pauschmann, G. Pausewang, E. Pracht, H. Rau, A. Rieker,
W. Rüdorff, W. Rundel, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann,
J. Strähle, H. Straub, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter,
W. Winter, W. Zeil.

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 43 21